Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin insensitiver Endopeptidase aus E. coli

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl-Heinz Müller
aus 7407 Rottenburg/1

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 1984

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. J. V. Höltje
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. P. T. Ammon

Die vorgelegte Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. U. Schwarz und Dr. J.V. Höltje am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen angefertigt. Für viele Anregungen und Diskussionen danke ich Dr. J.V. Höltje, Dr. U. Schwarz und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schwarz.
R. Wütz danke ich für das Durchsehen meiner Arbeit, G. Weinraub für die sorgfältige Ausführung der Graphiken Frl.S Haase und Frau R. Grömke-Lutz für die ausgezeichneten Abbildungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau J. Chamberlain und Frau I. Baxivanelis für viel Geduld und Sorgfalt bei den Schreibarbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG SEITE

I. Struktur and Funktion des Mureins 1

II. Mureinwachstum 5

A) Mureinbiosynthese 5

B) Penicillinbindeproteine 6

C) Mureinhydrolasen 8

III. Regulation der am Mureinmetabolismus beteiligten Enzyme 11

IV. Problemstellung 14

MATERIAL UND METHODEN

I. Chemikalien 16

II. Stämme und Kulturbedingungen 19

III. Substrate 19

A) Unmarkierte Sacculi 19

B) ^{3}H-Dap - markierte Sacculi 19

C) Muropeptide 20

IV. Enzymtests 21

A) Bestimmung der Transglykosylase-Aktivität mit Sacculi als Substrat 21

B) DD-Endopeptidase 22

V. Trennverfahren 24

A) Trennung von Muropeptiden 24

1. Papierchromatographische Trennung 24

2. Trennung von Muropeptiden über Hochdruckflüssigkeitschromatographie 24

B) Trennung von Proteinen 26

1. Säulenchromatographische Trennung - siehe Ergebnisteil 26

2. Sucrose Gradientenzentrifugation 26

3. SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese 27

VI. Immunologische Methoden 28

A) Immunisierung und Gewinnung von Antisera 28

B) Isolierung von Immunglobulin G (IgG) 28

C) Mikro-Ouchterlony-Test 29

D) Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Zellulose-Nitrat-Filter und immunologischer Nachweis von Antigenen durch Peroxidaseantiperoxidase Färbung 30

VII. Nachweismethoden 32

A) Proteinbestimmung 32

B) Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Silberfärbung 32

C) Bestimmung der Dap Konzentration 33

D) Bestimmung von SDS 33

VII. Sonstige Methoden 33

A) Koppeln von IgG an Trägermaterialien 33

B) Reinigung von Chalaropsis-Muramidase 34

C) Leitfähigkeits Messung 35

D) Messung der Radioaktivität 36

E) Reduktion von Muropeptiden 36

ERGEBNISSE

I. Enzymreinigungen 37

A) Kriterien für Enzymreinigungen 37

B) Reinigung der löslichen Transglykosylase 37

1. Vorversuche zur Ausarbeitung einer neuen Reinigungsmethode 37

2. Präparative Reinigung löslicher Transglykosylase 38

D) Reinigung der Penicillin insensitiven Endopeptidase 42

1. Probleme bei der Reinigung der Endopetidase 42

2. Reinigung des Enzyms durch Kombination von Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie 42

3. Antikörper gegen Penicillin insensitive Endopeptidase 51

a) Nachweis der Spezifität der Antikörper 51

b) Hemmung der enzymatischen Aktivität der Endopeptidase mit Antikörpern 54

4. Verbesserte Methoden zur Reinigung der Penicillin insensitiven Endopeptidase 55

5. Abschätzung der Kopienzahl von Penicillin insensitiver Endopeptidase in der Zelle 59

II. Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin insensitiver Endopeptidase 60

A) Versuche zum Nachweis eines Komplexes zwischen beiden Enzymen 60

1. Auswahl geeigneter Methoden zum Nachweis von Enzym-Komplexen 60

2. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Penicillin insensitiver Endopeptidase und löslicher Transglykosylase mit Gelfiltration 61

3. Sedimentationsverhalten der löslichen Transglykosylase in Gegenwart von Penicillin insensitiver Endopeptidase bei der Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation 62

4. Zusammenfassung 66

B) Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin insensitiver Endopeptidase 66

1. Stimulierung der Transglykosylase-Aktivität durch Endopeptidase-Aktivität 67

2. Endopeptidase-vorbehandelte Murein-Sacculi als Substrat für lösliche Transglykosylase 67

3. Beziehung zwischen Änderung der Mureinstruktur/ Quervernetzung und der erhöhten Transglykosylase-Aktivität 69

4. Reduzierende dimere Muropeptide und 1.6-anhydro dimere Muropeptide als Substrat für Penicillin insensitive Endopeptidase 74

III. Enzymatische Aktivitäten von Penicillin insensitiver Endopeptidase und membrangebundener Endopeptidase (PBP 4) an quervernetzten Muropeptiden in komplexen Mischungen 75

A) Spaltung quervernetzter Muropeptide durch Penicillin insensitive Endopeptidase (löslich) 79

B) Einwirkung von membrangebundener Penicillin sensitiver Endopeptidase auf reduzierende und 1,6-anhydro Muropeptide 80

DISKUSSION 84

A) Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin insensitiver Endopeptidase 84

B) Vergleich von Penicillin insensitiver Endopeptidase und membrangebundener Endopeptidase 86

C) Mögliche Funktionen eines kooperativen Transglykosylase/Endopeptidase-Systems 87

LITERATURVERZEICHNIS 91

ABKÜRZUNGEN

anti-Ep-IgG	Immunglobulin G gegen Penicillin-insensitive Endopeptidase
anti-LT-IgG	Immunglobulin G gegen lösliche Transglykosylase
CPM	Impulse pro Minute
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Dap	meso-Diaminopimelinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
E. coli	Escherichia coli
Epase	Endopeptidase
HPLC	High-performance-liquid-chromatography
LMW	Low Molecular Weight Calibration Kit
LT	Lösliche Transglykosylase
PBE	Polybuffer Exchanger (Pharmacia Fine Chemicals)
PBP	Penicillinbindeprotein
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX-100	Triton X-100

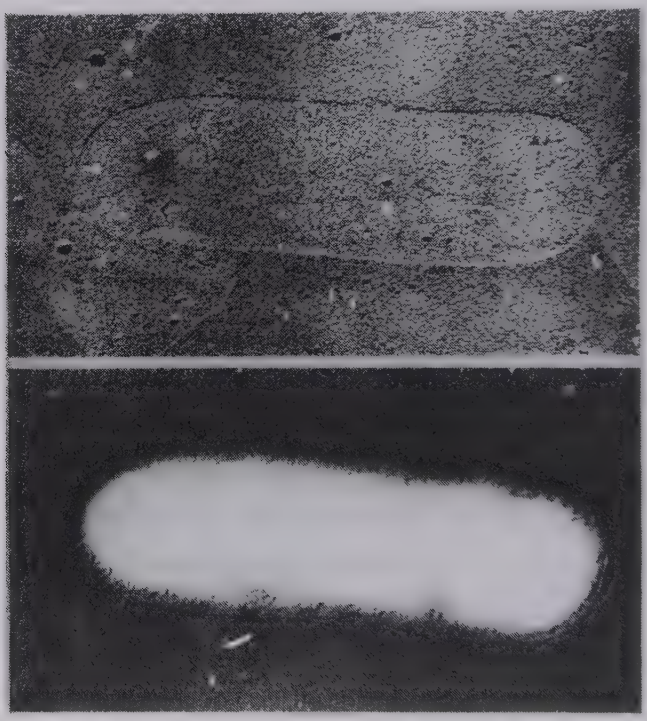
EINLEITUNG

I. Struktur und Funktion des Mureins

Eine charakteristische Eigenschaft jedes Lebewesens ist dessen äußere Gestalt. Als Modellsystem für die Erforschung des Entstehens von äußeren Formen eignen sich Bakterien aus mehreren Gründen besonders gut: Die Biochemie der Bakterien, speziell die des Darmbakteriums, Escherichia coli, ist im Vergleich zu anderen Organismen relativ gut bekannt, und sie haben im allgemeinen eine sehr einfache Form, die durch ein chemisch einfaches Makromolekül aufrecht erhalten wird. Dieses Murein oder Peptidoglycan genannte Makromolekül bildet ein Netz, das die ganze Bakterienzelle umgibt (1). Dadurch wird die mechanische und osmotische Stabilität sowie die Erhaltung der äußeren Form dieser Organismen gewährleistet. Zerstört man die Mureinschicht von E. coli unter Bedingungen, die Zell-Lyse verhindern, so nehmen die Bakterien Kugelform an (2).

Während in gram-postiven Bakterien das vielschichtige Murein die äußerste Schicht der Zellhülle bildet, ist das ein- bis zweischichtige Murein des gram-negativen Bakteriums Escherichia coli zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran eingebettet. Über ein kovalent gebundenes Lipoprotein ist das Murein in engem Kontakt mit der äußeren Membran (3) und bildet sozusagen die Matrix für die äußere Membran (4, 5). Durch schonendes Isolieren erhält man Murein-Sacculi, die noch die ursprüngliche Form des Bakteriums aufweisen.

Abbildung 1: Aus E. coli W 173-25 isolierte Murein-Sacculi



Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Murein-Sacculi aus E. coli. Sie haben noch die ursprüngliche Stäbchenform des Bakteriums. Endvergrößerung 40 000fach. Diese Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. H. Frank zur Verfügung gestellt.

Durch Einwirkung von Muramidasen aus Hühnereiweiß (Lysozym) oder Chalaropsis wird der Murein-Sacculus in seine Grundeinheiten zerlegt. Ursprünglich waren 4 Hauptbestandteile gefunden worden, C3, C4, C5 und C6. Eine genauere chemische Analyse ergab, daß es sich hierbei um Disaccharide aus N-Acetyl-Glukosamin und Muraminsäure handelt, die an der Muraminsäure

eine kurze Peptidseitenkette aus L-Alanin, D-Glutaminsäure, meso-Diaminopimelinsäure (Dap) und D-Alanin tragen. Die Muropeptide C3 und C4 sind bis-Disaccharid-Tetrapeptid-Dimere, die über eine Peptidbrücke von einem endständigen D-Alanin zu Dap der Nachbarkette verbunden sind. C5 und C6 sind die monomeren Bausteine des Mureins mit Tri- bzw. Tetra-Peptidseitenketten. Mit verfeinerten Analysenmethoden, insbesondere der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, konnten inzwischen etwa 60 Mureinbausteine nachgewiesen werden. Dabei fand man einen neuen Quervernetzungstyp, wahrscheinlich eine Peptidbrücke von Dap zu Dap (6).

Im Murein-Sacculus sind die Disaccharid-Untereinheiten über ß-1,4-glykosidische Bindungen zu linearen Zuckerketten von ca. 35 Untereinheiten kodensiert (7), die quer zur Längsachse des Sacculus orientiert sind (8). Etwa 40-50 Prozent der Disaccharid-Untereinheiten sind über die kurzen Peptidseitenketten mit benachbarten Zuckersträngen verbunden. An jede 10. Untereinheit ist über die α-Carboxylgruppe der Dap das "Braun'sche Lipoprotein" mit seinem C-terminalen Lysin gebunden (9). Die Enden der Zuckerketten bilden Disaccharid-Untereinheiten, deren Muraminsäure über eine 1,6-anhydro-Bindung cyclisiert ist (10, 11). Bei Spaltung von Murein mit der zelleigenen Muramidase entstehen Untereinheiten mit 1,6-anhydro-Muraminsäure.

Abbildung 2: Mureinstruktur in E. coli

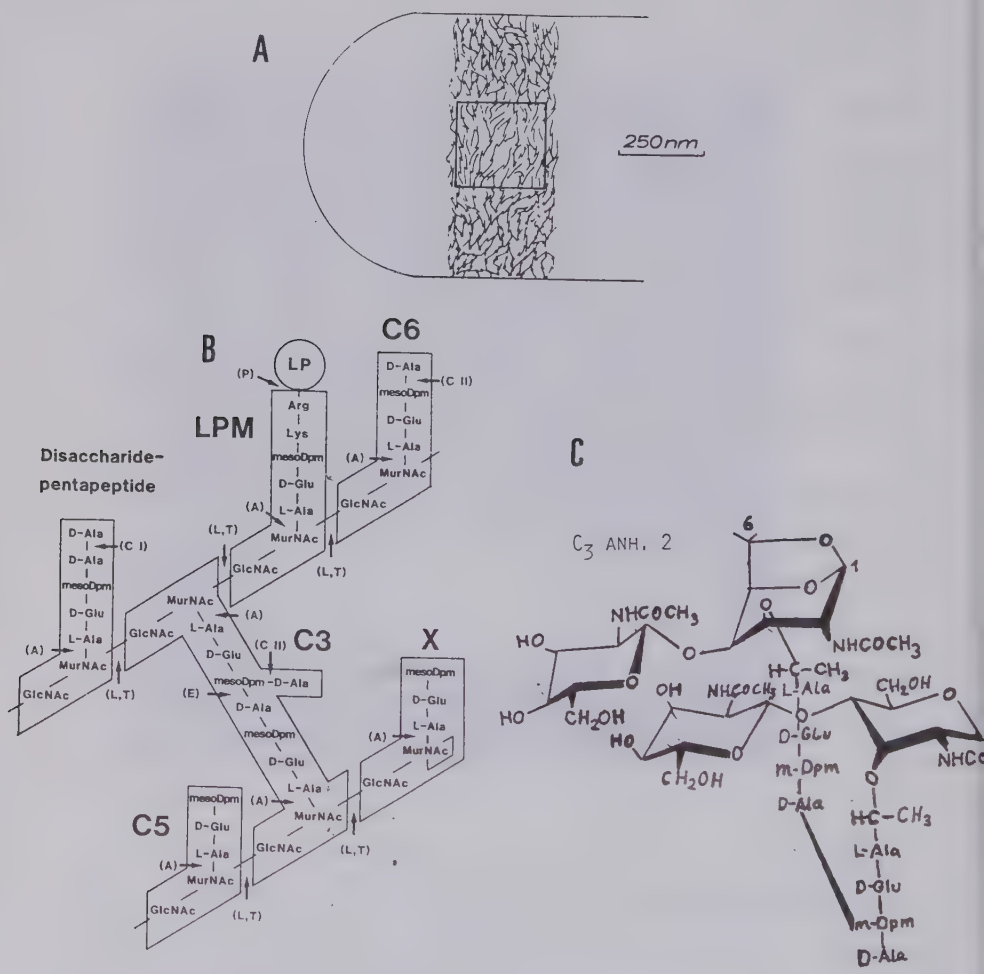


Abb. 2A: Schematische Anordung der Zuckerketten im Murein-Sacculus. Die Zeichnung wurde freundlicherweise von Dr. W. Keck zur Verfügung gestellt.
Abb. 2B: Chemischer Aufbau der Murein-Untereinheiten. Die beim Lysozymabbau entstehenden Muropeptide C3, C5, C6, X, LPM (C5 mit gebundenen Lys-Arg-Rest) und Disaccharidpentapeptid sind eingerahmt. Die Pfeile kennzeichnen die Spaltstellen der Mureinhydrolasen. A = Amidase; CI = DD-Carboxypeptidase I; CII = DL-Carboxypeptidase II; E = DD-Endopeptidase; L = Lysozym; P = Pronase; T = Transglykosylase (B. Glauner, Diplomarbeit).
Abb. 2C: Struktur eines dimeren Muropeptids mit 1,6-anhydro-Muraminsäure.

II. Mureinwachstum

Das relativ starre, die ganze Zelle vollständig umgebende Mureinnetzwerk, stellt das Bakterium während des Wachstums vor nicht unerhebliche Probleme. Zwangsläufig muß dieses Netz, bei gleichzeitiger Erhaltung der mechanischen Stabilität, mit der Zelle wachsen. Dabei ist es unumgänglich, daß in gewissem Ausmaß Bindungen im Murein geöffnet werden, um den Einbau von neuem Material zu gewährleisten. Deshalb wurde die Existenz von Mureinhydrolasen als lebensnotwendige Bestandteile der Bakterienzelle gefordert. Tatsächlich wurden diese auch in allen Bakterien gefunden, die Murein haben. In Escherichia coli wurden für die meisten möglichen Spaltstellen Mureinhydrolasen gefunden; die Spaltstellen der Enzyme sind in Abbildung 2B durch Pfeile gekennzeichnet. Eine Auflistung der bisher in E. coli gefundenen Mureinhydrolasen und deren Eigenschaften ist unter (12) zu finden. Während des Zellwachstums muß die mechanische Stabilität des Mureins aufgrund des in der Zelle herrschenden hohen osmotischen Drucks (1,13) - mehrere Atmosphären Überdruck - unbedingt erhalten bleiben. Daher dürfen Mureinhydrolasen nur streng kontrolliert wirken.

A. Mureinbiosynthese

Die Mureinbiosynthese kann in drei Stufen unterteilt werden. Die Synthese der hydrophilen Mureinvorstufen im Cytoplasma, den Transport der Vorstufen durch die Cytoplasmamembran durch Anhängen eines Lipidträgermoleküls und schließlich den Einbau der Vorstufen in das schon vorhandene Murein im periplasmatischen Raum. Während der Ablauf der Syntheseschritte im Cytoplasma und in der Cytoplasmamembran schon relativ gut

erforscht ist weiß man über die periplasmatischen Schritte der Mureinbiosynthese noch recht wenig.

Nach dem Transport durch die Cytoplasmamembran werden die Lipid-gebundenen Disaccharid-Untereinheiten direkt, ohne Bildung hochpolymerer Vorstufen, in bereits vorhandenes Murein eingebaut (14, 15). Dabei erfolgt der Einbau neuen Materials hauptsächlich in der Zellmitte, in der sogenannten Wachstumszone (16, 17). Dieser Einbau von Vorstufen ins Murein wird von verschiedenen Antibiotika gehemmt. Die ß-Lactam-Antibiotika, die auch heute noch in der Antibiotika-Therapie unersetzlich sind, unterbinden die Transpeptidierung und damit die Bildung von Peptidbrücken im Murein. Durch Moenomycin wird die Kondensierung der Disaccharid-Untereinheiten zu Zuckereinheiten verhindert.

B. Penicillin-Bindeproteine

Arbeiten mit diversen Mutanten, die je nach Wachstumsbedingungen als Kugeln, Stäbchen oder zum Teil sogar als Filamente wachsen, führten zur Annahme verschiedener Wachstumssysteme in E. coli und anderen Bakterien (18, 19, 20). Mindestens ein System ist hiernach für das Wachstum des Zylinders in die Länge, ein anderes für die Bildung von Septen und Polkappen zuständig. Die ß-Lactam-Antibiotika, die kovalent an die Zellmembran binden (21),beeinflussen wichtige Bestandteile dieser Systeme. Dabei werden die letzten Schritte der Mureinbiosynthese gehemmt. (22-26). Mit radioaktiv markierten ß-Lactam-Antibiotika konnten in der SDS-Gelelektrophorese Penicillinbinde-Proteine (PBP´s) in

E.coli Membranen nachgewiesen werden (27-31). Diese werden nach absteigendem Molekulargewicht als Penicillinbinde-Proteine 1-6 bezeichnet. Bei einigen Bindeproteinen konnte gezeigt werden, daß Penicillin an ein Serin im aktiven Zentrum des Enzyms bindet (32-34). Dabei ist Penicillin ein Strukturanaloges zum D-Alanyl-D-ala-dipeptid (35).

Um die Funktion der Bindeproteine zu untersuchen, wurden einzele Bindeproteine entweder durch Mutation oder durch Zugabe von ß-Lactam-Antibiotika mit spezifischer Affinität für das jeweilige Bindeprotein ausgeschaltet und der Effekt auf das Zellwachstum beobachtet. Dabei ergaben sich für die einzelnen Bindeproteine folgende Funktionen: Die Bindeproteine 1A und 1Bs zusammen sind für das Zellwachstum unerläßlich. Werden beide zusammen ausgeschaltet so führt dies unweigerlich zur Zelllyse. Fehlt eines dieser beiden Bindeproteine, so kann das andere offensichtlich dessen Funktion übernehmen. PBP $1B^-$ Mutanten zeigen eine erhöhte Menge an PBP 1A (36). Wird Bindeprotein 2 ausgeschaltet, so wächst E. coli in Kugelform (19). PBP 2 ist also für die Erhaltung der Stäbchenform notwendig. PBP 3 ist für die Septumsbildung wichtig. Ist es nicht mehr aktiv, so führt dies zur Ausbildung langer Filamente (19, 20). Die niedermolekularen Bindeproteine 4, 5 und 6 scheinen für das normale Wachstum von E. coli nicht essentiell zu sein. Ausschaltung dieser Bindeproteine führt nicht zu deutlich erkennbaren Wachstumsstörungen (37, 38, 39). Allerdings wachsen E. coli-Zellen, die PBP 5 überproduzieren, als Kugeln (40).

Sämtliche Bindeproteine konnten inzwischen in reiner Form isoliert werden. Für jedes Bindeprotein wurde zumindest indirekt, enzymatische Aktivität nachgewiesen. In vitro erwiesen sich die Bindeproteine 1-3 als bifunktionelle Enzyme, die Disaccharid-Untereinheiten zu Zuckerketten kondensieren und Peptidbrücken knüpfen können. Die Proteine haben also Transpeptidase- und Transglykosylase-Aktivität. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer spezifischen Aktivität, zum Teil in den Reaktionsprodukten und in ihrer Hemmbarkeit durch verschiedene ß-Lactam-Antibiotika (41-46; 47). Penicillinbindeprotein 4 konnte als Penicillin-sensitive Endopeptidase und Carboxypeptidase IB identifiziert werden; in vivo hat es möglicherweise Transpeptidase-Aktivität (48, 49, 50). Die Bindeproteine 5 und 6 sind identisch mit der Carboxypeptidase IA, die von Pentapeptiden das endständige D-Alanin abspaltet (51, 52, 53, 54, 55, 56). Die Kollektion der verschiedenen Bindeproteine stellt somit einen der wichtigsten Bestandteile im Mureinbiosynthese-Apparat dar. Der Einbau von neuem Material in den Sacculus erfolgt fast ausschließlich durch die Penicillin-Bindeproteine. Allerdings kann dies nur erfolgen, wenn zunächst Raum und Ansatzpunkte für den Einbau des neuen Materials geschaffen werden.

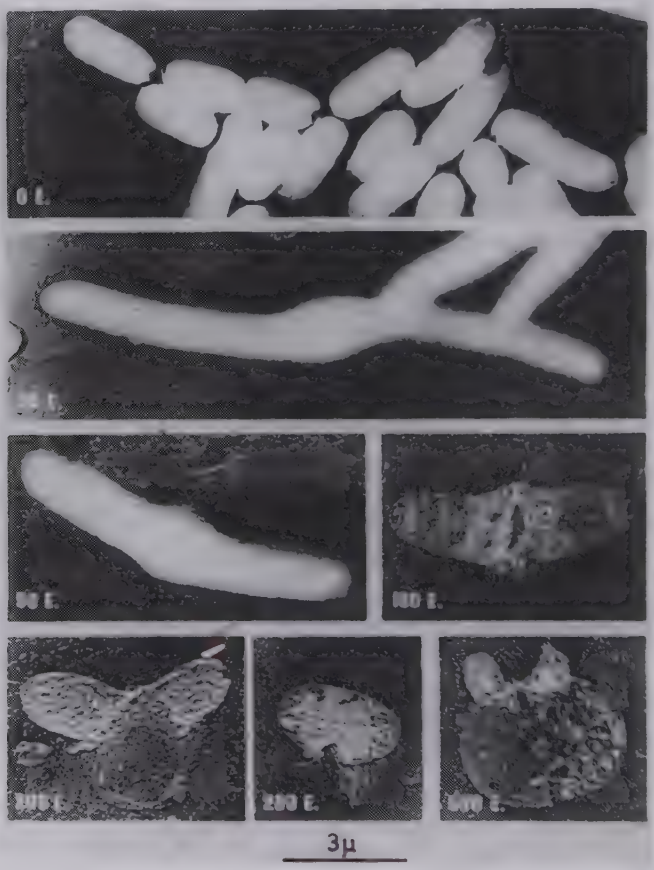
C. Mureinhydrolasen

Mureinhydrolasen, deren enzymatische Aktivität für den Neueinbau von Material in den Sacculus wichtig sein kann, wurden in großer Vielfalt in E. coli gefunden. Neben den Bindeproteinen 4-6 wurden weitere nicht Penicillin-empfindliche Hydrolasen entdeckt. Es handelt sich hier um Enzyme, die sowohl in der Zuckerkette spalten, Transglykolasen, Muramidasen und

Glukosaminidase, als auch in der Peptidseitenkette, im Falle von Amidase, Carboxypeptidase II und Penicillin-insensitiver Endopeptidase.

Die Existenz einer solchen Vielfalt von Mureinhydrolasen stellt für die Zelle eine große Gefahr dar. Um einen Abbau des für sie lebensnotwendigen Stützskeletts zu vermeiden, muß das Bakterium wirksame Kontrollmechanismen besitzen, die eine exakte zeitliche und räumliche Koordination zwischen Synthese- und Hydrolyse-Apparat gewährleisten. Mit Hilfe von Penicillin kann auf eindrucksvolle Weise das räumlich eng begrenzte Wirken von Mureinhydrolasen demonstriert werden. Inkubiert man E. coli mit ansteigenden Penicillin G-Konzentrationen, so können in Abhängigkeit von der Konzentration an Penicillin unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Zunächst kommt es in der Zellmitte zu Ausbuchtungen, dann zu scharfen Schnitten in der Mitte und schließlich zur kompletten Lyse der Zelle (22). Der Hydrolyse- und Synthese-Apparat ist also offensichtlich in der Zellmitte räumlich eng begrenzt wirksam.

Abb. 3: Wirkung ansteigender Penicillinmengen auf E. coli



Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergr. 8 000fach) wurden freundlicherweise von Dr. Frank zur Verfügung gestellt.

Eine zeitlich kontrollierte Aktivität des Synthese-Hydrolyse-Apparats konnte durch Bestimmung der Penicillin-Empfindlichkeit, Mureinsyntheserate und der spezifischen Aktivität von Mureinhydrolasen in sich synchron teilenden Zellen nachgewiesen werden (57, 58, 59, 60). Diese Arbeiten zeigten auch eine Beziehung zwischen DNS-Replikation und der Aktivität des Mureinsynthese- und Hydrolasen-Apparats auf.

Über die Funktion und Regulation der Mureinhydrolasen in E.coli weiß man bisher noch sehr wenig. Theoretisch könnten ein bis zwei hydrolytisch Aktivitäten Mureinwachstum ermöglichen.Es gibt aber mindestens 9 Mureinhydrolasen in E.coli, von denen einige in vitro die gleiche Reaktion katalysieren. Man kennt zwar die Aktivitäten der Mureinhydrolasen in vitro, in vivo konnte bisher jedoch nur Endopeptidase-Aktivität direkt nachgewiesen werden (48). Bisher konnten auch noch keine geeigneten Mutanten - Mutanten mit Defekten im Zell- oder Mureinwachstum oder in der Zellteilung, Mutanten, die keine Restaktivität oder ein weiteres Enzym, das die Aufgabe des mutierten Gens übernehmen könnte, haben - in Mureinhydrolase-Genen isoliert werden. Die Untersuchung solcher Mutanten könnte schlüssige Aussagen über die Funktion des jeweiligen Gens erbringen.

III. Regulation der am Mureinmetabolismus beteiligten Enzyme

Über die Kontrolle der Mureinhydrolasen und die Feinabstimmung von Mureinsynthese- und Hydrolyse-Apparat weiß man noch sehr wenig. Wird diese Feinabstimmung gestört, so kann dies katastrophale Folgen für die Zelle haben. So führt eine Hemmung der Synthese-Enzyme mit ß-Lactam-Antibiotika oder Moenomycin zur Lyse der Bakterien. Desgleichen kann man die

Autolyse von E. coli mit Dap-Aushungerung und verschiedenen Schockbehandlungen auslösen (61, 62). Wie der genau ausbalancierte Mureinsynthese/hydrolyse-Apparat bei der Autolyse gestört wird ist noch weitgehend unbekannt. Die Zelle hat viele Möglichkeiten lebensnotwendige biologische Vorgänge zu kontrollieren. Dabei können solche Regulationsfunktionen auf den unterschiedlichsten Ebenen des Metabolismus verwirklicht werden.

Durch Steuerung der Enzymmenge über Synthese und Abbau, durch chemische Modifikation der Enzymaktivität, durch Synthese inaktiver Vorstufen, durch Regulatoren und Co-Faktoren kann die Bakterienzelle ihren Mureinsynthese/-hydrolasen-Apparat beeinflussen. In vielen Arbeiten findet man Beispiele solcher Arten von Regulation von am Mureinmetabolismus beteiligten Enzymen (63-65; 66-68). Räumlichen Kontrolle kann das Bakterium über die Verteilung der Enzyme in bestimmte Bereiche der Zelle erreichen. Jedoch scheint das beobachtete räumlich eng begrenzte Wirken von synthetischen und hydrolytischen Enzymen in E. coli scheint in der Regel nicht durch Verteilung der Enzyme auf verschiedene Bereiche der Zelle (69, 70) zustande zu kommen.

Mit der stringenten Kontrolle besitzt E. coli einen generellen Mechanismus, um sich äußeren Mangelsituationen anzupassen. Über die Produktion des Regulators 3´,5´-Guanosinbispyrophosphat (ppGpp) wird unter solchen Bedingungen die Synthese von ribosomaler RNA, transfer RNA, Phospholipiden und Polyanionen drastisch herabgesetzt. Wie Ishiguro und Mitarbeiter zeigen konnten, unterliegt auch die Mureinbiosynthese diesem Regulationsmechanismus (71). Durch ppGpp werden die

cytoplasmatischen Schritte so beeinflußt, daß eine Anhäufung von Mureinvorstufen nicht stattfindet (72). Durch Veränderung der Membranstruktur unter ppGpp-Wirkung werden auch die periplasmatischen Schritte der Mureinbiosynthese beeinflußt. Dies führt zum erniedrigten Einbau von neuem Material in den Sacculus und einer geringeren spezifischen Carboxypeptidase I-Aktivität (73, 74).

In der intakten Zelle könnte eine Barriere zwischen Mureinhydrolasen und Murein als Substrat bestehen und so ein unkontrollierter Abbau verhindert werden (75). Da der Murein-Sacculus ein komplexes die ganze Zelle vollständig umgebendes Substrat ist, bietet er eine ideale Möglichkeit, die Aktivitäten vieler Enzyme räumlich zu steuern. Zum Beispiel können durch räumlich eng begrenzte Strukturveränderungen, wie Änderung des Quervernetzungsgrades oder-typs, Modifikation der Zucker- oder Peptidseitenketten Angriffspunkte für Enzyme beseitigt und geschaffen werden. Verändertes Murein konnte als Ursache für Resistenz gegenüber bestimmten Mureinhydrolasen gefunden werden (76, 77).

Mit vielen bisher erwähnten Regulationsmechanismen werden immer nur ein oder wenige Enzyme des komplexen Mureinstoffwechselsystems zusammen reguliert. Möglicherweise wird ein großer Teil des Mureinsynthese-hydrolaseapparates in Abhängigkeit von der DNS-Replikation gesteuert. So unterbleiben bei der Blockierung der DNS-Replikation die vor Beginn der Zellteilung feststellbaren Schwankungen in der Aktivität des Mureinbiosynthese-Apparats (57, 58). Außerdem werden sehr viele Mureinhydrolasen durch Einzelstrang DNS und Oligonukleotide stark gehemmt (78, 79, 80). Zusätzlich konnte bei fast allen

Penicillin-Bindeproteinen eine Bindung an Oligonukleotide und verwandte Substanzen (Poly-U, Heparin etc.) gezeigt werden (81). Eine von der Zelle bei komplexen biochemischen Prozessen häufig benutzte Kontrollmöglichkeit stellen Multienzymsysteme dar. Solche Multienzymkomplexe findet man beispielsweise bei der Fettsäuresynthese, vielen Bereichen der DNS-Synthese und Kohlehydratsynthese. In solchen Komplexen kann die Aktivität vieler Enzyme genau aufeinander abgestimmt werden. Sie ermöglichen ein räumlich und zeitlich eng begrenztes Wirken vieler Enzyme. Das jeweilige Reaktionsprodukt eines Enzyms kann direkt an das andere weitergegeben werden. Da die Enzyme in solchen Komplexen direkten Kontakt miteinander haben, können durch Strukturänderung oder die Aktivität von Schlüsselenzymen mit wenigen Molekülen ganze Kaskaden ausgelöst werden und so maximaler Effekt mit minimalem Aufwand erreicht werden. Auch beim Mureinstoffwechsel wäre eine Beteiligung solcher Multienzymkomplexe sinnvoll. Bei Quervernetzungsexperimenten mit Membranen von E. coli ergaben sich Hinweise auf Komplexe zwischen den Penicillin-Bindeproteinen 1, 3 und 5. Ein solcher Komplex könnte für die Bildung des Septums in E. coli eine wichtige Funktion haben (82).

IV. Problemstellung

Hinweise auf einen Komplex zwischen zwei löslichen Mureinhydrolasen ergaben sich bei der Reinigung eines dieser beiden Enzyme (12). Bei der Isolierung Penicillin-insensitiver Endopeptidase aus E. coli wurde stets auch lösliche Transglykosylase mit angereichert. Dies war ein erster Hinweis auf einen möglichen Komplex zwischen den beiden Enzymen. Endopeptidasen und Transglykosylasen spielen offenbar bei autolytischen

Prozessen eine wesentliche Rolle (83). Somit ist die genaue Untersuchung des Zusamenspiels von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopeptidase für das Verständnis von Autolysevorgängen wichtig. Damit kann auch ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus, der für die Antibiotika-Therapie so bedeutenden ß-Lactam-Antibiotika geleistet werden. Die beiden Enzyme sollen isoliert, ihre Aktivität allein und in Verbindung mit dem zweiten Enzym charakterisiert und gegenüber Enzymen mit gleicher Spezifität abgegrenzt werden. Sind die Enzyme und deren Wechselwirkungen untereinander in vitro genau charakterisiert, so ist es möglich gezielt nach Mutanten und neuen Testsystemen zu suchen, die auch Aussagen über die Aktivität der Enzyme in vivo erlauben. Dadurch erhält man neue Aspekte über die Funktion von Mureinhydrolasen und über die Koordination von Mureinsynthese und -Abbau in der Bakterienzelle.

MATERIAL UND METHODEN

I. Chemikalien

Enzyme

α-Amylase v. Bac.subt. 600 U/mg analytical grade	Serva/Heidelberg
Desoxyribonuklease I (DNase I) aus Rinderpankreas 450 Kunitz-Einheiten/mg	Serva/Heidelberg
Lysozym aus Hühnereiweiß ca. 25 000 E/mg	Serva/Heidelberg
Pronase E 70 000 PUK/g	Merck/Darmstadt

Antisera

Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex (PAP; rabbit)	Miles/Frankfurt
Antiserum gegen lösliche umd membrangebundene Transglykosylase	von F.B. Wientjes zur Verfügung gest.
Ziege-anti-Hasen IgG-Serum	von H. Schwarz zur Verfügung gestellt

Radiochemikalien

^{3}H-meso-Diaminopimelinsäure 33 Ci/mMol	CEA/Frankreich

Säulenmaterialien

CM-Sepharose CL-6B	Pharmacia Fine Chemicals/Schweden

DEAE-Sepharose CL 6B	Pharmacia Fine Chemicals/Schweden
Poly U-Sepharose 4B	
Heparin-Sepharose 4B	
Blue-Sepharose CL 6B	
Poly-buffer-exchanger (PBE) 94	
Protein A-Sepharose 4B	
Aktivierte Sepharose 4B	
Sephadex G75-SF	
Bio-Gel P30	Bio-Rad Laboratories
Affi-Gel 10	

Puffer

Kaliumphosphat-Puffer (Kp): 10 mM Phosphat, pH 7,0
0,1 mM DTE + 0,02 % NaN_3

Phosphat-gepufferte Saline (PBS): 10 mM Natriumphosphat,
pH 7,0 + 140 mM NaCl
+ 0,1 M DTE + 0,02 % NaN_3

Puffer A: PBS + 100 mM $MgCl_2$

Puffer B: 10 mM Tris/Maleat-Puffer,
pH 5,2 + 10 mM $MgSO_4$
+ 0,1 mM DTE + 0,02 % NaN_3

Polybuffer: Zur Elution von chromatofocusing-Säulen wurde Polybuffer 96 (Pharmacia fine Chemicals) 1:13 verdünnt und mit 0,1 M Essigsäure auf pH 5,6 eingestellt.

Sonstige Chemikalien

N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB) kristallisiert p.a.	Merck/Darmstadt
4-Chloro-1-naphthol	Sigma/München
Coomassie-Brilliantblau R 250 für Elektrophorese	Merck/Darmstadt
DL-α,ε Diaminopimelinsäure (Dap)	Sigma/München
5-Dimethylamino-naphtalin-1-sulfochlorid (Dansylchlorid) puriss.p.a.	Fluka/Buchs
2,5-Diphenyloxazol (PPO) puriss.,	Koch-Light-Labs. England
1,4-Dithioerythrit (DTE) reinst	Serva/Heidelberg
Harnstoff ultra pure reagent	BRL/Neu-Isenburg
Electrophoresis low-molecular-weight calibration kit (LMW) mit Phosphorylase b 94 000 D, RSA 67 000 D, Ovalbumin 43 000 D, Carboanhydrase 30 000 D, Sojabohnen Trypsin Inhibitor 20 100 D, α-Lactalbumin 14 000 D	Pharmacia Fine Chemicals/Schweden
Penicillin G-Kaliumsalz 1590 U/mg	Serva/Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma/München
Triton X-100 prakt.	Serva/Heidelberg

Die hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von Merck/Darmstadt im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

II. Stämme und Kulturbedingungen

Enzymisolierung

Mureinhydrolasen wurden im präparativen Maßstab aus E. coli K12 Stamm PA3092 (dap) isoliert. Die Bakterien wurden bei 37°C in Nutrient-Broth-Medium (Difco) 8 g/l unter Zugabe von Natriumchlorid 5 g/l, Lysin 20 mg/l, Dap 4 mg/l, und Thymin 50 mg/l unter Belüftung gezüchtet. Die Zellen wurden in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{578} von 0,6-0,7 ($4-5 \times 10^8$ Zellen/ml) geerntet und bei -70°C gelagert; etwa 500-600 g Zellen wurden für eine Aufarbeitung verwendet.

III. Substrate

A. Unmarkierte Sacculi

Mureinsacculi wurden entweder aus frisch gezüchteten oder aus bei -70°C gelagerten Zellhüllen isoliert. Durch Kochen mit SDS (4%) konnten daraus die Mureinsacculi isoliert werden. Zur Abspaltung des Lipoproteins und des im Murein eingeschlossenen Glykogens wurden die Sacculi mit Pronase und α-Amylase verdaut (12, 86, 87, 88). Anschließend wurde der Dap-Gehalt bestimmt (Seite 32) und die Mureinkonzentration errechnet.

B. ^{3}H-Dap-markierte Sacculi

Zur Isolierung von radioaktiv markierten Muropeptiden und Mureinsacculi wurde der E. coli K12 Stamm W173-25/7 (W7 Dap, Lys) verwendet. Der durch Mutagenisierung von W173-25 abgeleitete Stamm eignet sich besonders gut zur Präparation von radioaktiv markierten Mureinsacculi, da er keine Dap-Decar-

boxylase enthält. Da in diesem Stamm Dap nicht zu Lysin decarboxyliert werden kann, ist es möglich, Murein selektiv mit Dap mit hoher spezifischer Radioaktivität zu markieren. Dazu wurden die Zellen in Minimal-Citrat-Glukose-Medium mit 10 mCi ^{3}H-Dap (33 Ci/mMol), 1,5 mg/l unmarkierter Dap und 20 mg/ l Lysin bis zu einer OD_{578} von 0,6-0,7 gezüchtet und bei 4^{o}C durch Zentrifugation bei 12 500 x g für 20 Min geerntet. Die Isolierung der Sacculi erfolgte nach der bereits oben erwähnten Methode. Die spezifische Radioaktivität betrug etwa 85 mCi/mMol (Murein), mehr als 50% der angebotenen Dap wurden ins Murein eingebaut. Für Standard-Hydrolasentests wurden die radioaktiven Sacculi mit unmarkierten Sacculi auf $3x10^{6}$ CPM/mg Murein (Zählausbeute 41%) und 0,5 mg Murein/ml eingestellt.

C. Muropeptide

Zur präparativen Herstellung von Muropeptiden wurden Sacculi mit Chalaropsis Muramidase (siehe Seite 34) 16 Stunden bei 37^{o}C verdaut (10 mg Chalaropsis Muramidase/mg Murein in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8; spez. Aktivität Chalaropsis Muramidase $1,1.10^{7}$ E/mg - 1 Einheit entspricht der Freisetzung von 1 pMol Murein pro Minute; Temperatur 37^{o}C). Nach Zerstörung der Muramidase durch 5-minütiges Kochen wurden grobe Verunreinigungen durch Zentrifugation (30 Min, 10 000g) abgetrennt und der Überstand lyophylisiert. Die Muropeptide wurden in Aqua bidest. aufgenommen und die Isolierung der einzelnen Muropeptide wurde entweder über präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (6) oder über präparative Papierchromatographie vorgenommen. Wurden die einzelnen

Muropeptide über Papierchromatographie gereinigt, so wurde zunächst durch Gelfiltration über eine Sephadex G25f-Säule eine Vorfraktionierung in "Oligomere", Dimere (C3 und C4) und Monomere durchgeführt. Der Verlauf der Gelfiltration wurde durch Absorptionsmessung bei 202 nm verfolgt, die genaue Muropeptidzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Die Auftrennung in die einzelnen Muropeptide wurde durch Papierchromatographie auf Whatman 3MM-Papier (Papierchromatographie S.24) erzielt. Bei radioaktiv markierten Muropeptiden wurde die Lage der einzelnen Substanzen mit Hilfe einer Isotopen-Kamera (Zinsser, Frankfurt) ermittelt. Die entsprechende Bereiche wurden ausgeschnitten und die Muropeptide mit Aqua bidest. eluiert.

IV. Enzymtests

A. Bestimmung der Transglykosylase-Aktivität mit Sacculi als Substrat.

In diesem Test wird das Ausmaß der Solubilisierung von intakten Mureinsacculi durch Mureinhydrolasen bestimmt. Da in *E. coli* nur lösliche und membrangebundene Transglykosylasen (10, 89, 90,) in der Lage sind, aus intaktem Murein TCA bzw. CTAB lösliche Bestandteile abzuspalten, bestimmt man mit diesem Test spezifisch die Transglykosylaseaktivitäten. In einem Gesamtvolumen von 100 ul wurden 5-40 ul Enzym mit 10 ul ^{3}H-Dap Sacculi-Suspension (5 ug Murein; $3x10^{3}$ CPM pro ug; Natriumacetat Puffer 100 mM, pH 5,6; 0,2% Triton X-100; 0,02%

NaN_3) 5-60 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt, unverdaute Sacculi und hochmolekulare Mureinbruchstücke wurden durch Zugabe von 100 ul 1% CTAB-Lösung ausgefällt. Nach 20-minütiger Inkubation im Eisbad wurde das Präzipitat 2 Min bei 12 000 x g abzentrifugiert und vom Überstand 100 ul vorsichtig zur Messung der Radioaktivität abpipettiert. Aus der ermittelten Radioaktivität wurde die spezifische Aktivität der Transglykosylase folgendermaßen ermittelt.

Als Transglykosylase-Einheit wurde die Menge an Transglykosylase definiert, die nötig ist um bei 37°C ein Picomol Muropeptide in einer Minute aus intaktem Murein freizusetzen.

Mureinmenge pro Test: 5 ug = 15 000 cpm 50 % des Testansatzes werden gezählt.

1 ug Murein entspricht:

$$\frac{1 \times 10^3 \text{ nM}}{941} = \frac{1000 \text{ pMol}}{0{,}941}$$ MG einer Mureinuntereinheit = 941 D

Transglykosylase-Aktivität:

$$\frac{\text{gemessene CPM} \times 5\ \mu g \times 1000\ \text{pMol}}{7500\ \text{CPM} \times 0{,}941\ \mu g \times \text{Inkubationszeit}} = \text{Transglykosylaseeinh.}$$

B. DD-Endopeptidase

Die Endopeptidasen spalten spezifisch DD-Peptidbindungen. Für die *in vitro* Endopeptidasetests wurde ^{3}H-Dap markiertes C3 (Bis-Disaccharid-Tetrapeptid) als Substrat verwendet, es wird durch die DD-Endopeptidase in zwei Disaccharid-Tetrapeptideinheiten (C6) gespalten. Die Auftrennung von Substrat und

Produkt erfolgte über Papierchromatographie oder HPLC. Erfolgte die Auftrennung über HPLC so wurde mit $NaBH_4$ reduziertes C3 als Substrat verwendet.

Im Standardenzymtest wurden in je 40 ul Gesamtvolumen 5-15 ul Enzym mit 5 ul ^{3}H-Dap-markiertes C3 (350 pmol, $6x10^4$ cpm) in Tris-Maleat (10 mM, pH 6.0 für Penicillin-insensitive Endopeptidase: pH 8,0 für Penicillin-sensitive Endopeptidase + 10 mM $MgSO_4$ + 0,2% Triton X-100 + 0,02% NaN_3), 10 bis 60 Min bei 37°C inkubiert. Die Penicillin-Empfindlichkeit wurde durch Zugabe von Penicillin G-Kaliumsalz ($2x10^4$ M) bei pH 8 (s.o.) getestet. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Proben 3 Min im Wasserbad gekocht, für die Trennung über Papierchromatographie lyophilisiert, in 10 ul H_2O bidest wieder aufgenommen und auf das Papier aufgetragen. Zur Auftrennung über HPLC wurden die Proben durch Zugabe von 10 ul 2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 2,5, auf einen pH <3 eingestellt und auf die Säule gegeben. Die DD-Endopeptidase-Aktivität wurde über das prozentuale Verhältnis der Radioaktivitäten von Reaktionsprodukt und eingesetztem Substrat bestimmt:

$$\frac{\text{CpmxProduktx100}}{\text{Cpm (Substrat + Produkt)}} = \text{\% Substrat umgesetzt}$$

Als eine Enzymeinheit der Endopeptidase-Aktivität wurde die Spaltung von 1 Picomol C3 in 2 Picomol C6 pro Minute bei 37°C definiert.

V. Trennverfahren

A. Trennung von Muropeptiden

1. Papierchromatographische Trennung

Die papierchromatographische Trennung erfolgte in einem absteigenden System auf SS2040 Papier - analytische Trennung 18-24 h Laufzeit -, oder auf Whatman 3MM Papier - präparative Trennung 72 h Laufzeit - bei 24°C. Als Laufmittel diente die Oberphase eines Gemisches aus n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (91). Die Elution der Muropeptide aus dem Papier erfolgte nach dem unter (92) beschriebenen Verfahren.

2. Trennung von Muropeptiden über Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

In dem von B. Glauner (6) entwickelten System werden die Muropeptide aufgrund verschieden starker hydrophober Wechselwirkungen mit den C18-Einheiten des Trägermaterials aufgetrennt. Da unter den Laufbedingungen die verschiedenen anomeren Formen der einzelnen Muropeptide aufgetrennt werden, wurde die Anomerisierung durch Reduktion mit Natriumborhydrid (Seite 36) verhindert. Bei der präparativen Isolierung nicht reduzierter Muropeptide wurde bei unterschiedlichen pH-Werten mehrmals rechromatographiert (6).

a) Analytische Trennung.

Säulen: I) 250 mm/4 mm mit Lichrosorb 5 um RP 18 Trägermaterial (Merck, Darmstadt)

II) 250 mm/4,6 mm mit Shandon Hypersil ODS 3 um Trägermaterial (Bischoff, Leonberg)

Elutionsmittel: Linearer Gradient von Puffer A (50 mM Natriumphosphat, pH 4,33) nach Puffer B (50 mM Natriumphosphat, pH 5,03 + 15 % Methanol)

Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

Laufzeit des Gradienten: 2 h 15 min

Temperatur: 53°C

Probe: reduziert Muropeptide 50 pMol-100 nMol in 40-200 ul, pH 4

Auswertung: a) Radioaktive Proben fraktioniert in 442 bzw. 624 Fraktionen von je 0,1 ml; die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler bestimmt und mit einem Integrations-Plott-Programm (B. Glauner) auf einem Wang 700 Serien-Rechner ausgewertet.

b) unmarkierte Proben: UV-Absorption wurde bei 202 nm gemessen und über ein Waters Data Modul ausgewertet.

b) Routine-Enzymtests (siehe Test von DD-Endopeptidase, Seite 23):

Säule: 125 mm/4,6 mm Lichrosorb 5 um RP 18 (Merck, Darmstadt)

Elutionsmittel: 50 mM Natriumphosphat, pH 2,8, 15 % Methanol

Fließgeschwindigkeit: 0,6 ml/h

Laufzeit: 11 min bei RT

Probe: 50 ul ^{3}H-Dap-Muropeptide (350 pMol C3)

Auswertung: Fraktionierung in 0,3 ml Fraktionen, Radioaktivität wurde in Szintillations-

zählern bestimmt.

Präparative Trennung: Soweit nichts anderes angegeben, sind die Bedingungen gleich wie bei der analytischen Trennung.

Säule: 300 mm/7,8 mm Bondapak RP 18 10 um Waters

Elutionsmittel: siehe analytische Trennung

Fließgeschwindigkeit: 2 ml/h

Probe: bis zu 30 mg Murein in max. 0,5 ml

B. Trennung von Proteinen

1. Säulenchromatographische Trennung - siehe im Ergebnisteil

2. Sucrose-Gradientenzentrifugation

Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde verwendet, um mögliche Enzymkomplexe nachzuweisen. Jeweils 100-150 ul Proteingemisch wurden vorsichtig auf einen linearen Sucrose-Gradienten von 5-20 % Sucrose in Wasser oder Puffer (Tris-Maleat 20 mM, pH 6,0 mM $MgSO_4$ + 0,4 % Triton X-100, 0,02 % NaN_3 1 mM DTE) aufgetragen. Nach 24-26stündiger Zentrifugation (40 000 RPM, 4°C, Beckman SW 56 Rotor, Gradientenvolumen 4,5 ml Meniskus 5,8 cm), wurde der Gradient in 25-35 Fraktionen aufgeteilt, die jeweils auf Transglykosylase- und Endopeptidase-Aktivität getestet wurden. Das Sedimentationsverhalten von möglichen Transglykosylase/Endopeptidase-komplexen verschiedener Stöchiometrie wurde rechnerisch ermittelt (93, 94).

3. SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Reinheit und des Molekulargewichts einzelner Proteine diente die SDS-Disc-Acrylamid-Gelelektrophorese (95). Die Proben wurden durch Verwendung unterschiedlicher Puffer und Acrylamidkonzentrationen in Sammel- und Trenngel (Sammelgel 2,5% Acrylamid, Tris HCl Puffer, pH 6,8; Trenngel 10% oder 8-18% Gradient Acrylamid, Tris HCl Puffer, pH 8,8) im Sammelgel bei niedriger Stromstärke (12,5 mA, 45 Min) fokussiert, so daß eine hohe Auflösung mit scharfen Proteinbanden in einem Molekulargewichtsbereich von 15 000- <100 000 D erzielt wurde. Die Trennung erfolte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA (3-4 Std.). Die Gele wurden 30 Min fixiert und gefärbt (1,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 454 ml 50%iges Methanol, 46 ml Eisessig) und entfärbt (75 ml Eisessig, 50 ml Methanol, 875 ml Wasser) (96).

Probenvorbereitung: Je nach Proteingehalt wurden 20-500 ul Probe mit eiskalter 10% TCA ausgefällt und die Sedimente 1 mal mit 10% TCA und 1 mal mit eiskaltem Aceton/0,1 N HCl gewaschen. Die getrockneten Präzipitate wurden im Probenpuffer (o,o625M Tris/HCl; 2% SDS; 10% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 5% Mercaptoäthanol; pH 6,8 aufgenommen; 10-60 ul) und 3 Min gekocht.

VI. Immunologische Methoden

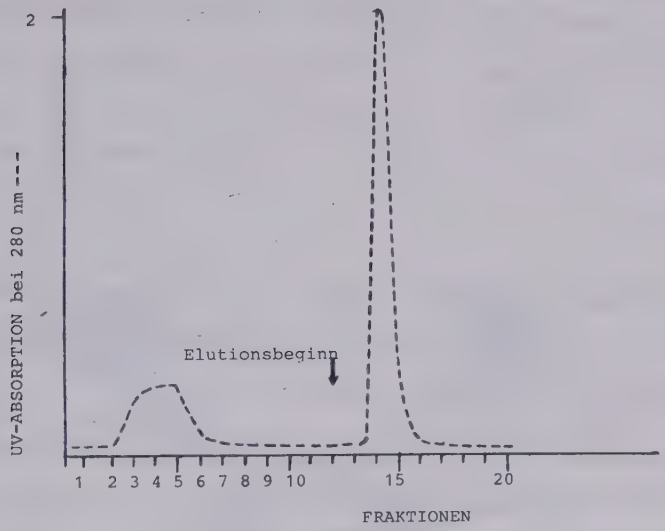
A. Immunisierung und Gewinnung von Antisera

Spezifische Antisera wurden aus Kaninchen gewonnen. Antigen (500 ul 80 ug reines Enzym) wurden in 2 ml Freund'-schem Adjuvans (inkomplett) emulgiert und an verschiedenen Stellen subcutan und intramuskulär (Hinterläufe) in gleichen Portionen injiziert. Nach fünf Wochen wurde derselbe Vorgang mit 120 ug Enzym in 500 ul wiederholt (Booster). Eine Woche danach wurden dem Hasen, 8-10 Wochen lang, wöchentlich je 50 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde zunächst 30 Min bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 25 000 x g, 4°C, über 20 Min wurde der Blutkuchen vom Serum abgetrennt. Das so gewonnene Serum wurde bei -70°C aufbewahrt.

B. Isolierung von Immunglobulin G (IgG)

IgG wurde über Protein A-Sepharose-Affinitätschromatogrphie aus dem Serum isoliert; dabei bindet IgG über seinen Fc-Teil spezifisch an Protein A. Mit dieser Methode können innerhalb von 2 Stunden ca. 100 mg IgG in einem Schritt aus dem Serum isoliert werden.

Abb. 4: Reinigung von IgG aus Serum über Protein A-Sepharose



--- UV-Absorption bei 280 nM.
Fünfzehn ml Serum in PBS, pH 7,4, wurden auf eine Protein A-Sepharose-Säule (Protein A-Sepharose, Pharmacia, 5 ml Gel, Betthöhe 6,5 cm, 1 cm Säulendurchmesser Pumpgeschwindigkeit 40-50 ml/h) aufgepumpt. Mit 0,58% Essigsäure in 0,15 M NaCl konnte das IgG in einem scharfen Gipfel von der Säule eluiert werden (97). Elution bei verschiedenen pH-Stufen trennt IgG in seine Unterklassen auf (98).

C. Mikro-Ouchterlony-Test

Zum Nachweis spezifischer Antikörper und zur Bestimmung des relativen Antikörpertiters wurden Mikro-Ouchterlony-Doppeldiffusionstests durchgeführt. Dazu wurden Objektträger mit 0,8% Agarose in PBS, pH 7,4, beschichtet (0,25 mm Schichtdicke). Antiserum und Antigen, in verschiedenen Konzentrationen (jeweils 25 ul) wurden mit Hilfe einer Auftragsschablone direkt auf die Agaroberfläche gegeben. Nach 2-3tägiger Inkubation in einer feuchten Kammer war alle Flüssigkeit in die

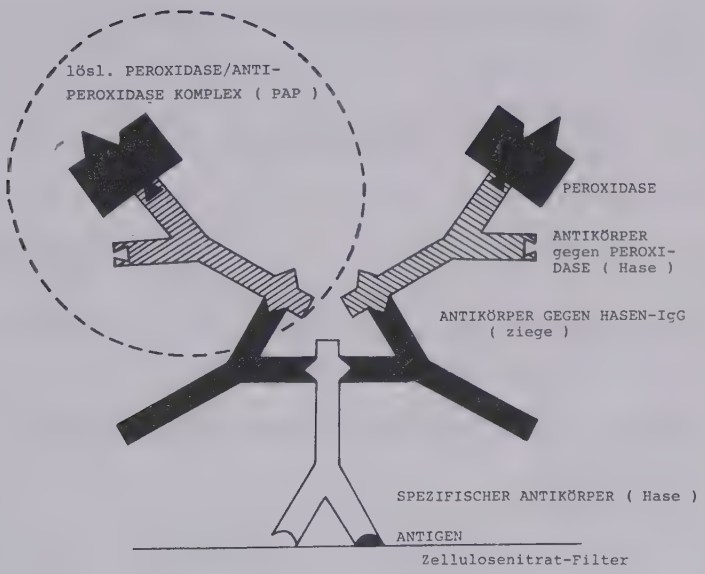
Agarose eingesickert und es hatten sich Immunpräzipitate gebildet. Die Immunpräzipitate wurden nach 2 - 3maligem Waschem mit PBS mit Coomassie Brilliant Blau R-250 (0,05% Coomassie Brillant Blau in 25% Isopropanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Dieser Mikro-Test ist wegen der sehr dünnen Agaroseschicht und des äußerst geringen Durchmessers der Schablonenbohrungen (0,5 mm ø) außerordentlich empfindlich.

D. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Zellulose-Nitrat-Filter und immunologischer Nachweis von Antigenen durch Peroxidaseantiperoxidase-Färbung

Zur Charakterisierung von Antigenen und von Antisera wurden Proteine, nachdem sie über SDS-Acrylamidelektrophorese aufgetrennt worden waren, elektrophoretisch auf Zellulosenitrat-Filter transferiert ((99); 0,4 A Stromstärke 1,5 - 2 Stunden in einer Bio-Rad Trans-Blot-Zelle; 0,3 % Tris, 1,44% Glycin 20% Methanol bei 4°C). Danach wurden freie Proteinbindestellen auf den Filtern mit 1 % RSA in PBS abgesättigt (3-5 Stunden). Spezifische Immunkomplexe wurden gebildet, wenn die Filter hintereinander mit Antiserum (1:50-1:500 in PBS + 0,1% RSA), Ziegen-Serum gegen Hasen IgG (1:100 in PBS + 0,1 % BSA und einem löslichen Immunkomplex aus Peroxidase-anti-Peroxidase-Antikörpern (Miles)(Antikörper aus Hasen isoliert) (1:500 in PBS + 0,1 % RSA) jeweils mehrere Stunden geschüttelt wurden. Die Filter mußten nach jeder Inkubationsperiode gründlich mit PBS + 0,1 % Triton X-100 gewaschen werden (4maliger Pufferwechsel). Spezifische Antigene können durch Bildung eines violetten Farbstoffes, der durch enzymatische

Oxidation aus 4-Chloro-1-Naphtol entsteht, nachgewiesen werden (100, 101).

Abb. 5: Schematische Darstellung dieser Methode



Legende Abb.5: Die spezifischen Antikörper reagieren mit dem fixierten Antigen. Die aus Ziegen isolierten Antikörper gegen Hasen IgG reagieren einerseits mit dem fixierten spezifischem Antikörper, andererseits mit dem IgG des Peroxidase/antiPeroxidase Komplexes. Durch die Ziegenantikörper als Zwischenglied erreicht man gegenüber Nachweismethoden, die nur einen, den Antigenspezifischen, Antikörper benutzen, einen Verstärkungseffekt.

VII. Nachweismethoden

A. Proteinbestimmung

Proteine wurden entweder nach der Methode von Lowry (102) oder von Bradford (103) bestimmt. Bei der Lowry Protein-Bestimmung tritt in Proben mit hohem Salz- oder Triton X-100-Gehalt ein Niederschlag auf, der vor der Extinktionsmessung 2 Min bei 12 000 x g abzentrifugiert wurde. Bei niedrigem Proteingehalt und bei Proben mit Komponenten, die den Lowry Proteintest stören, wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Bei dieser Proteinbestimmung wird die Menge an blauem Protein-Coomassie-Brilliant-Blue G250 Komplex durch Messung der Extinktion bei 595 nm bestimmt. Dieser Test ist empfindlicher als die Lowry-Proteinbestimmung und wird von vielen Substanzen, die beim Lowry-Test stören, nicht gestört.

B. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Silberfärbung

Zur Überprüfung der Reinheit von isolierten Enzymen diente als sehr empfindliche Nachweismethode die Silberfärbung, die selbst Spuren von Verunreinigungen noch nachweisen kann. Unter verschiedenen publizierten Methoden erwies sich die Silberfärbung nach Morrissey (104) als die vorteilhafteste, da sie am besten reproduzierbar war, den geringsten Verbrauch an Silbernitrat hat, nicht mit unstabilen, explosiven Lösungen durchgeführt wird und mindestens genau so empfindlich ist wie andere Silberfärbungen (ca. 100mal empfindlicher als Coomassie-Färbung). Da die ersten Schritte der Silberfärbung identisch mit der Coomassie-Färbung sind, konnten die Gele

nach der Coomassie-Färbung direkt mit Silber gefärbt werden. Zu stark gefärbte Gele wurden mit Tetenal Superfix (1 Teil + 5 Teile Wasser; Tetenal Hamburg-Berlin) entfärbt.

C. Bestimmung der Dap-Konzentration

Murein wurde quantitativ über den Gehalt an Dap bestimmt (12). Die Mureinkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Mureingehalt der Probe: } \frac{\text{Menge an Dap (mg)} \times 941\text{mg}}{192\text{mg}} = \text{xmg:941= x Mol}$$

941 D = Molekulargewicht der Disaccharid-Untereinheit
192 D = Molekulargewicht von Dap

D. Bestimmung von SDS

Bei der Präparation von Mureinsacculi und Muropeptiden muß SDS sorgfältig ausgewaschen werden, da Enzymreaktionen durch SDS gestört werden. Mit der von Hayashi (105) beschriebenen Methode ist es möglich, rasch zu bestimmen, ob die SDS-Konzentration einen bestimmten Grenzwert unterschritten hat. SDS bildet mit Methylenblau einen Chloroform-löslichen Komplex, während Methylenblau allein nicht Chloroform löslich ist. Mit entsprechenden Standardlösungen können noch SDS-Konzentrationen unter 1 ug/ml nachgewiesen werden.

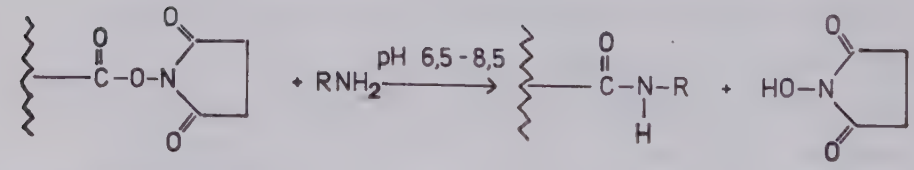
VIII Sonstige Methoden

A. Koppeln von IgG an Trägermaterialien

Das Koppeln von IgG an aktivierte Sepharose-Derivate wurde nach den Vorschriften der Hersteller vorgenommen (aktivierte Sepharose CH 4B; Pharmacia Broschüre, 1981 "Affinity Chroma-

tography; principles and methods S. 24-27, Affi-Gel 10 Bio-Rad: Bulletin 1085 "Activated Affnity Supports", Affi-Gel^{R} 10 und 15) 10 bis 15 mg IgG pro ml Gel wurden über die freien Aminogruppen an die Gel-Matrix gebunden, durch Bestimmung der Protein-Konzentration vor und nach dem Koppeln konnte die Menge an gebundenem IgG ermittelt werden; 80 - 90% des eingesetzten IgGs konnte gebunden werden. Nachdem das Gel gründlich gewaschen worden war und mit dem jeweiligen Auftragspuffer äquilibriert war, konnte es direkt zur Immunoaffinitätschromatographie benutzt werden.

Kopplungsvorgang:



N-HYDROXISUCCINIMID-AKTIVIERTE-SPHAROSE

IgG-SEPHAROSE

N-HYDROXISUCCINI

Chemische Darstellung des Koppelungvorgangs

B. Reinigung von Chalaropsis-Muramidase

Zucht und Ernte des Chalaropsis-Pilzes wurde wie von Hasch und Rothlauf (106) beschrieben durchgeführt. Das Kulturfiltrat (Chalaropsis-Muramidase ist ein Exoenzym) wurde direkt auf eine auf pH 3,5 äquilibrierte CM-Sepharose 6B-Säule aufgepumpt (300 ml Gel, 60 cm Betthöhe, o 2,6 cm pro 5 L Kultur-

filtrat, Pumpgeschwindigkeit 180 ml/h). Mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 500 mM Ammoniumacetat, pH 5,5 (Gradientenvolumen 1 500 ml) wurde die Muramidase von der CM-Sepharose eluiert (Elution zwischen 100 und 300 mM Salz). Zur Konzentrierung und weiteren Reinigung wurde das Enzym mit Ammoniumsulfat ausgefällt (70 % Sättigung), nach Zentrifugation (25 000 x g, 30 Min) wurde der Niederschlag in 2 ml Wasser aufgenommen. Durch Gelfiltration über Bio-Gel P30 konnte die Muramidase von Ammoniumsulfat und fast allen Verunreinigungen abgetrennt werden (im 13% Acrylamid-Gel war nur ein zusätzliches Protein nachweisbar, MW ca. 10 000, ca. 1-5 %). Die Muramidase-Aktivität wurde im Sacculi-Test bestimmt und daraus die spezifische Aktivität ermittelt ($1{,}15 \times 10^7$ E/mg; siehe Transglykosylase-Einheit). Bei der Analyse des von dieser Muramidase-Präparation verdauten Mureins über Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnten keine störenden Enzymverunreinigungen nachgewiesen werden. Das Enzym wurde auf eine Proteinkonzentration von 100 ug/ml eingestellt und bei $-70^{\circ}C$ gelagert. Für die enzymatische Spaltung von Murein wurden bis zu 500 ug Murein pro 20 ul Enzymlösung 16 Stunden bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

C. Leitfähigkeitsmessung

Die Ionenstärke von Puffern und Lösungen wurden mit einem Konduktometer (Mod. LF 39 der Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim/Obb.) gemessen.

D. Messung der Radioaktivität

Proben in wässriger Lösung (0,1-0,3 ml) wurden in Triton-Toluol-Szintillator (1 Teil Lösung, 10 Teile Szintillator - 10 g PPO in 1 l Toluol und 2,5 l Triton X-100) gemessen. Für Proben auf Papier und Filterscheiben wurde nach Zugabe von 0,2 ml Wasser der gleiche Szintillator benutzt. Die Proben wurden in Flüssigkeitsszintillatonszählern der Firma Packard gemessen, dabei betrug die Zählausbeute bei ^{3}H-markierten Proben 40-50%. In Chromatogrammen wurde die Lage von radioaktiven Substanzen mit einer Isotopenkamera (Birchover Instruments, England) bestimmt.

E. Reduktion von Muropeptiden

Bei der Auftrennung von Muropeptiden über Hochdruckflüssigkeitschromatographie erwies es sich als notwendig, die Muropeptide zu reduzieren, um eine Anomerisierung der Zucker zu verhindern. Nach der von B. Glauner erarbeiteten Methode (6) wurden 100 ul Muropeptide (maximal 5 mg/ml) mit 100 ul 0,5 M Natriumboratpuffer, pH 9, und 2 mg Natriumborhydrid versetzt und die Reduktion nach sorgfältigem Mischen 30 Min bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die Mischung mit Phosphorsäure auf pH 4 eingestellt und direkt auf die Säule aufgetragen.

ERGEBNISSE

I. Enzymreinigungen

A. Kriterien für Enzymreinigungen

Für Experimente mit reinen Enzymen und zur Gewinnung von Antikörpern war es erforderlich, sowohl die Transglykosylase als auch die Endopeptidase mit hoher spezifischer Aktivität und hoher Ausbeute zu isolieren. Da die beiden Enzyme sehr labil sind und nur in geringer Menge in der Zelle vorkommen, hatte sich deren Reinigung als sehr schwierig erwiesen (10,12). Daher wurde versucht, durch Anwendung neuer Techniken den Reinigungsvorgang zu verbessern.

B. Reinigung der löslichen Transglykosylase

1. Vorversuche zur Ausarbeitung einer neuen Reinigungsmethode

In Vorversuchen wurde mit immobilisierten Antikörpern gegen lösliche Transglykosylase (anti LT IgG-Sepharose, siehe Material und Methoden) versucht, einen möglichen Komplex zwischen diesem Enzym und Penicillin-insensitiver Endopeptidase schonend zu isolieren. Während lösliche Transglykosylase gut an die Antikörpersäule gebunden wurde, konnte für Penicillin insensitive Endopeptidase kein Binden nachgewiesen werden. Aus dem Rohextrakt konnte allerdings nicht alle meßbare Transglykosylaseaktivität (50-80%) an die anti-LT-IgG-Sepharose gebunden werden. Dies dürfte auf die Anwesenheit einer zweiten, der membrangebundenen, Transglykosylase und auf Störfaktoren, die die Antigen/Antikörper-Reaktion negativ beeinflussen, zurückzuführen sein. Unter vielen möglichen

Elutionsmitteln (107,108) erwies sich Harnstoff als am besten geeignet. Mit 8 molar Harnstoff konnte die lösliche Transglykosylase in einem scharfen Gipfel mit hoher spezifischer Aktivität eluiert werden (Reinigungstabelle).

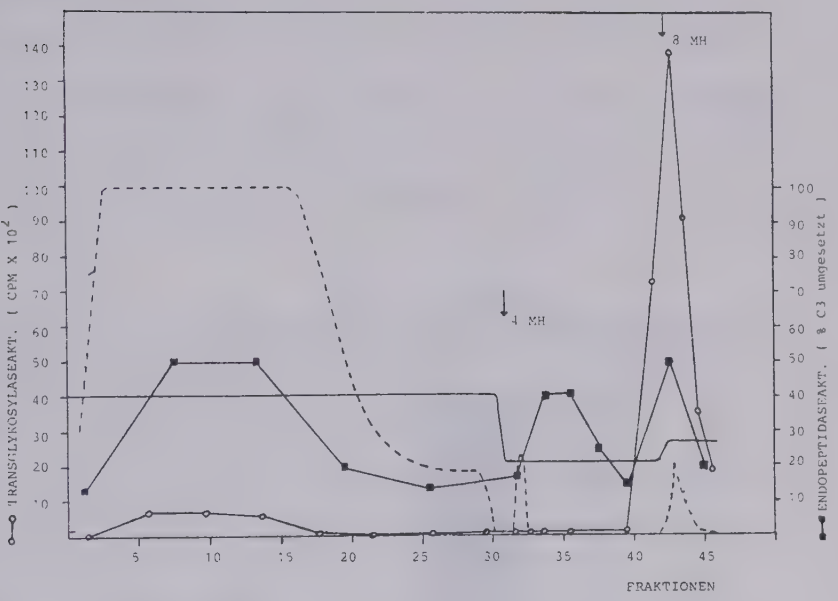
2. Präparative Reinigung löslicher Transglykosylase

50 Gramm tiefgefrorene E.coli PA 3092 wurden in 100 ml Tris-maleat-Puffer (10mM pH 6,8 + 10mM $MgSO_4$ + 0.1 mM DTE + 0,02% NaN_3 + 20 ug/ml DNAse)resuspendiert. Die Zellen wurden unter Eiskühlung mit einer French pressure cell press (American Instruments Company) bei 14-18000 psi geöffnet. Nach 30 minütigem Rühren bei 4°C (Abbau der DNS) wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (9000 x g, 15´ bei 4°). Nach dem Abzentrifugieren von Membranen und Membranbruchstücken (48 000 x g, 4h bei 4°C) wurde der Rohextrakt 2 mal gegen 10 das fache Volumen von Puffer A (Chemikalien) dialysiert. Zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Immunoadsorbens erwies sich ein Puffer mit hohem Salzgehalt als notwendig.

Bei der Dialyse ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit Puffer A äquilibrierte anti-LT-IGg-Sepharose Säule aufgepumpt. Nach intensivem Waschen wurde die Säule mit 4M und 8M Harnstoff eluiert; die Transglykosylase eluierte mit 8M Harnstoff (Abb.6). Die Fraktionen mit Transglykosylaseaktivität sowie die Fraktionen der 4M Harnstoffstufe wurden jeweils vereinigt und gegen Kaliumphosphatpuffer (10mM pH7 + 0.2% Triton x 100) dialysiert. Das Enzym wird teilweise durch Harnstoff reversibel denaturiert, die Enzymaktivität des dialysierten Proteins steigt daher während mehrtägiger Aufbewahrung bei 4°C erheblich an.

b) Reinheitsbestimmung

Abb. 6: Diagramm: Reinigung lösl. Transglycosylase

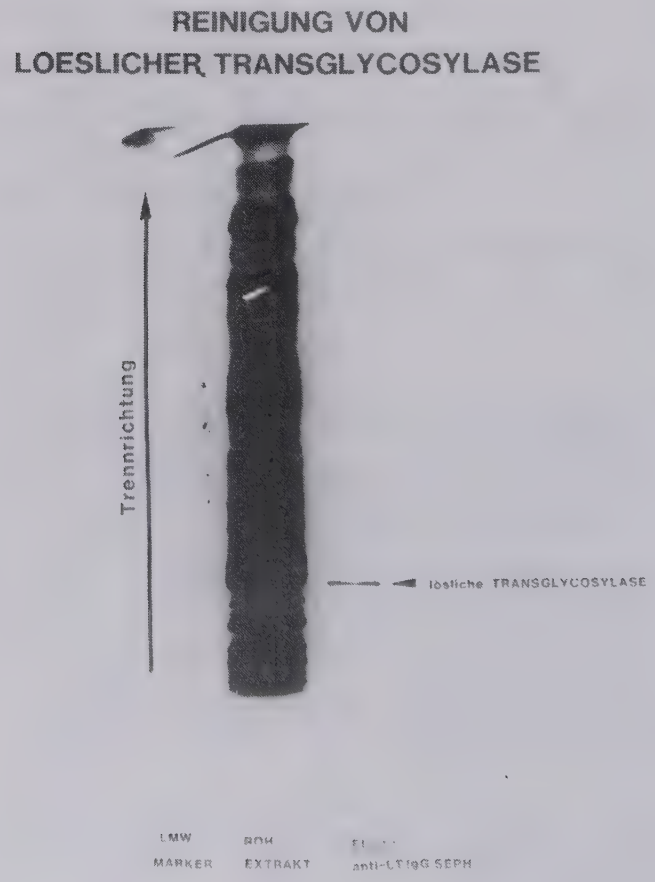


Legende Abb.6: Der gegen Puffer A dialysierte Rohextrakt (84 ml) wurde auf die mit demselben Puffer äquilibrierte Säule aufgepumpt (K9 Säule Pharmacia, 13ml Gel, 20 cm Betthöhe, Pumpgesch. 25ml/h). Die Säule wurde mit 7 Säulenvolumina Puffer A gewaschen und mit 4M Harnstoff in Puffer A + 0,2% Triton X-100 (4 Säulenvolumina) und 8 M Harnstoff in Puffer A + 0.2% Triton X-100 H) eluiert. Durchlauf, Waschpuffer und Eluate wurden in Fraktionen zu je 6 ml gesammelt. In einzelnen Fraktionen wurden Transglykosylase und Endopeptidaseaktivität bestimmt (Mat.u.Meth.). Die Fraktionen 32-37 (Eluat 4M Harnstoff, 37 ml) und 42-45 (Eluat 8M Harnstoff, 24 ml) wurden vereinigt und gegen Kaliumphosphat-Puffer (s.o.) dialysiert.
--- UV Adsorption bei 280 nm; —— Leitfähigkeit; o—o Transglykosylaseaktivität (cpm x 10^2 freigesetzte Radioaktivität); ■—■ Endopeptidaseaktivität (% C_3 im Enzymtest umgesetzt).

Die im Eluat mit 8M und mit 4M Harnstoff gefundene Endopeptidaseaktivität (Abb. 6) konnte nach der Dialyse im Dialysat

nicht mehr nachgewiesen werden. Bei der Dialyse entstand in beiden Eluaten ein Niederschlag, in dem geringe durch Penicillin hemmbare Endopeptidaseaktivität (insgesamt 5oo Einheiten) gefunden wurde. Wahrscheinlich hatte Penicillin sensitive Endopeptidase über hydrophobe Wechselwirkungen an das Säulenmaterial gebunden und war durch Harnstoff eluiert worden.

Abb. 7: Reinheits-und Molekulargewichtsbestimmung der Eluate im 10% SDS-Acrylamid-Gel



Legende Abb. 8: Auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10%) wurden Eichproteine (0,75ug Protein pro Bande), Rohextrakt (300ug) und reine lösl. Transglykosylase-8MH Eluat dialysiert-(1,5ug) aufgetragen und aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brillant-Blau gefärbt.Bahn 1 Eichproteine (Pharmacia); Bahn 2 Rohextrakt; Bahn 3 reine LT.

Reinigungstabelle

EINIGUNGSSCHRITT	GESAMTPROTEIN	GESAMTAKT.	SPEZ. AKT.	REINIGUNGSFAKTOR	AUSBEUTE
OHEXTRAKT	2640 mg	$45x10^3$ E	17 E/mg	1	100%
LUAT 8 M HARNSTOFF (REINES ENZYM)	0,72 mg	$351x10^3$ E	$4,88x10^5$E/mg	28700	780%

Reinigungstabelle und Proteinmuster auf Polyacrylamid-Gelen zeigen, daß mit Immunoaffintätschromatographie LT in einem Schritt direkt aus Rohextrakt gereinigt werden kann.
Die spezifische Aktivität des reinen Enzyms und die Ausbeute sind wesentlich höher als bei den bisher publizierten Reinigungsmethoden (Reinigungstabelle, 10,80,90). Die Gesamtaktivität des reinen Enzyms istviel höher als die im Rohextrakt nachweisbare (780% Ausbeute). Das zeigt, daß die lösliche Transglykosylase im Rohextrakt, entweder durch spezifische Inhibitoren (68)oder andere Faktoren (DNS,12,80), stark gehemmt wird. Mit dieser Methode ist es möglich jederzeit große Mengen an löslicher Transglykosylase zu isolieren. Innerhalb weniger Wochen kann die LT sogar in solchen Mengen gereinigt werden, die für die Ermittlung der Aminosäuresequenz oder die Kristallisation des Enzyms ausreichen. Versuche auch die membrangebundene Transglykosylase über Immunoaffintätschromatographie zu reinigen scheiterten, da das Enzym nicht an eine spezifische Antikörpersäule gebunden werden konnte.

D. Reinigung der Penicillin insensitiven Endopeptidase

1. Probleme bei der Reinigung der Endopeptidase

Die in der Zelle vorhandene Menge an Penicillin-insensitiver Endopeptidase ist 10-50 fach niedriger als die der löslichen Transglykosylase. Für die Reinigung dieses Enzyms ist daher die Entwicklung sehr selektiver Reinigungsmethoden notwendig. Selektive Reinigung der insensitiven Endopeptidase über Affinitätschromatographie an immobilsierten dimeren Muropeptiden (109,110) war nicht möglich, da diese über die freie Aminogruppe der Dap an das Trägermaterial gebunden wurde. Die Endopeptidase ist nicht in der Lage, an dimere Muropeptide, die keine freie Aminogruppe an der Dap haben, zu binden bzw. diese zu spalten (111).
Bei Versuchen, Penicillin-insensitive Endopeptidase nach der von W.Keck (12) ausgearbeiteten Methode zu reinigen, traten bei der Entsalzung der stark angereicherten Enzymfraktionen (Spez. Akt. >50000 E/mg) mit allen benutzten Methoden große Verluste an Enzymaktivität auf (mehr als 50%). Daher wurde die bisherige Reinigungsmethode durch entsprechende Kombination der Säulen, Anwendung eines neuen Trennprinzips und Wahl der Säulengröße so modifiziert, daß angereicherte Enzympools nicht mehr entsalzt werden mußten.

2. Reinigung des Enzyms durch Kombination von Ionenaustausch und Affinitätschromatographie

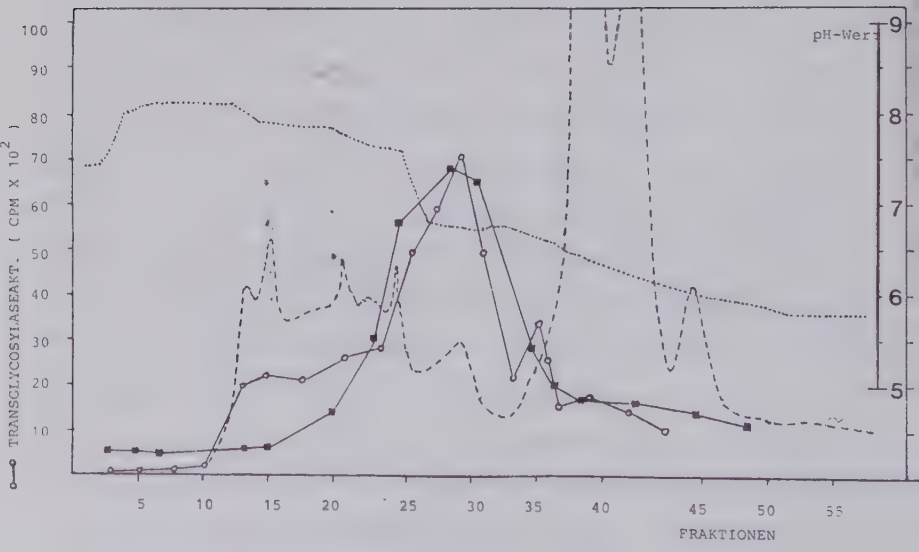
560 g tiefgefrorene E.coli PA 3092 wurden in 1120 ml Puffer (Tris/Maleat 10mM pH 6,8, + 10 mM $MgSo_4$ + 0.1mM DTE + 0.02% NaN_3 + 20 uG/ml DNAse) resuspendiert. Die Zellen wurden unter

Eiskühlung mit einer French pressure cell (LT - Reinigung) bei 14-18000 psi geöffnet (sämtliche weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt). Nach halbstündigem Rühren wurden die Zelltrümmer bei (15 000 x g) abzentrifugiert. Sämtliche Membranbestandteile wurden sorgfältig durch Zentrifugation (60 Min, 143 000 x g) abgetrennt. Der Rohextrakt löslicher Enzyme wurde dreimal gegen 10 faches Volumen Puffer B (Tris-/Maleat 10mM pH 5,2, 10mM $MgSo_4$, 0.1 mM DTE, 0.02% NaN_3) dialysiert. Nachdem die bei der Dialyse ausgefallenen Proteine abzentrifugiert worden waren (25 000 x g, 15 Min) wurde der Rohextrakt auf eine CM-Sepharose Säule aufgepumpt (Pumpgeschwindigheit 60 ml/h, 400 ml Gel, Säulendurchmesser 5cm). Die Säule wurde mit Puffer B (5-8 Säulenvolumina) gewaschen und mit einem linearen Kaliumchloridgradienten (0-500 mM in Puffer B, 4 Säulenvolumina) eluiert. Fraktionen mit Endopeptidaseaktivität wurden vereinigt (435 ml) und durch Ultrafiltration (76 mm Ø, PM 10 Membran) auf 45 ml konzentriert. Das konzentrierte CM-Eluat wurde 2 mal gegen 10 faches Volumen Kaliumphosphatpuffer (10mM pH 8.5, 0.1mM DTE, 0.02% NaN_3) dialysiert und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule aufgepumpt. Da Endopeptidase nur sehr schwach an DEAE-Sepharose bindet, war eine Elution mit sehr flachen Salzgradienten (0-80 mM KCl über 5 Säulenvolumina in Kaliumphosphatpuffer 10mM pH 8,0) möglich. Bei optimaler Säulendimensionierung (7.5 -12,5 mg Protein/ml Säulenmaterial) konnte die Penicillin-insensitive Endopeptidase bei KCl Konzentrationen von 10-30 mM stark angereichert (CM-Sepharose und DEAE - Anreichungsfaktor >1000) eluiert werden. Die Fraktionen mit Endopeptidaseaktivität (147 ml) wurden ohne Entsalzung direkt weiter aufgearbeitet.

Chromatofocusing

Eine von Pharmacia neu entwickelte Methode zur säulenchromatographischen Trennung von Proteingemischen erwies sich als sehr hilfreich bei der Reinigung der Endopeptidase. Bei dieser Trennmethode baut sich durch die besondere Zusammensetzung des Gelmaterials und des Elutionspuffers während der Elution ein linearer pH-Gradient auf der Säule auf (112). Mit dieser Methode werden die Proteine am pI fokussiert und gleichzeitig eluiert; man erreicht damit eine sehr hohe Auflösung.

Abb. 8: Fraktionierung der Penicillin-insensitiven Endopeptidase auf einer Chromatofocusing-Säule.



Legende Abb. 8: Die über CM- und DEAE-Sepharose angereicherte Endopeptidase (147 ml) wurde mit 16 ml 250 mM Imidazol-/Acetatpuffer, pH 7,4, versetzt und über eine Chromatofocusing-Säule weitergereinigt (Material PBE 9-4 26 ml, 33 cm Betthöhe, Säulendurchmesser 1cm, Pumpgeschwindigkeit 20 ml/h, Fraktionsgröße 6,5 ml). Eluiert wurde mit 13 Säulenvolumina "Polybuffer" 9-6, 1:13 verdünnt / Acetat pH 5,7. In dem linearen pH Gradienten von pH 7 nach pH 5,7 eluierte die Penicillin-insensitive Endopeptidase bei pH-Werten von 6,6 - 6,8. Bei höheren Ausgangs pH-Werten (pH 8,5) und höherer Ionenstärke eluierte die Endopeptidase in einem Gradienten von pH 8,5 nach 6 bei pH 7,6 - 7,8. Die Fraktion mit hoher Endopeptidase-Aktivität (Fraktionen 24-34, 74 ml) wurden vereinigt und über Poly-U-Sepharose weitergereinigt.
•••• pH-Wert; ■—■ Endopeptidaseaktivität (% C_{23} gespalten);
○—○ Transglykosylaseaktivität (CPM 10^{23} solubilisiert);
- - - UV-Adsorption bei 280 mM.

Abb. 9: Analyse des "Chromatofucusing" Säulenlaufes mit SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.

Legende Abb. 9: Auf ein 2-phasiges SDS-Polyacrylamid-Gel (Start - Gelmitte 10%, Gelmitte - Gelende 15% Acrylamid) wurden ausgewählte Fraktionen des "Chromatofocusing" Säulenlaufs (Abb. 9) aufgetragen. Zusätzlich wurden noch die Eluate der beiden ersten Reinigungsschritte dieser Enzymaufarbeitung aufgetragen (Eluat CM- und Eluat DEAE-Sepharose). Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliantblau gefärbt.
Proteine aus: Bahn 2-12 je 40 ul, Bahn 13,50 ul, Bahn 14,100 ul.

Bahn 1 LMW Marker Pharmacia 3ul	Bahn 8 Fraktion 33
Bahn 2 Fraktion 15	Bahn 9 Fraktion 35
Bahn 3 Fraktion 23	Bahn 10 Fraktion 38
Bahn 4 Fraktion 25	Bahn 11 Fraktion 41
Bahn 5 Fraktion 27	Bahn 12 Fraktion 44
Bahn 6 Fraktion 29	Bahn 13 CM-Pool 50 ul
Bahn 7 Fraktion 33	Bahn 14 DEAE-Pool 100ul

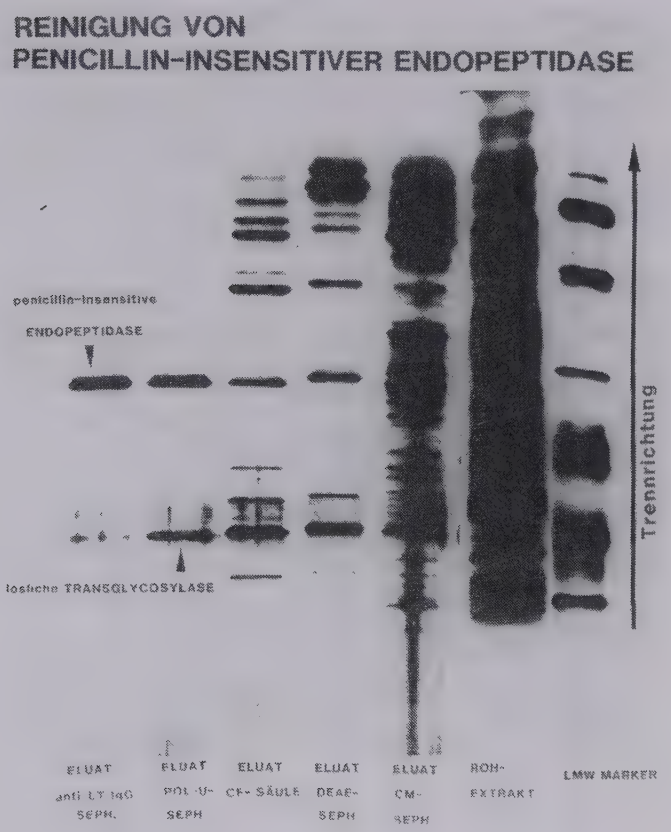
Bahn 15 LMW Marker Pharmacia 3 ul siehe Seite ; lösliche Transglykosylase (LT) und Penicillin insensitive Endopeptidase (EP) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Bei diesem Reinigungsschritt wird der Hauptteil der löslichen Transglykosylase von der Penicillin-insensitiven Endopeptidase abgetrennt (Abb. 9 Bahn 2-5 und Abb. 8 Fraktionen 13-24). Jedoch ist die Transglykosylase-Aktivität im Endopeptidase-Gipfel am höchsten (Abb. 8 Fraktion 29, 30), obwohl in den Fraktionen 13-24 erheblich mehr Transglykosylase ist (Abb. 9). Offensichtlich wird die Aktivität der löslichen Transglykosylase durch die Penicillin-insensitive Endopeptidase erheblich stimuliert (siehe Teil II).

Fraktionen mit Endopeptidaseaktivität (74 ml) wurden zur weiteren Reinigung und Abtrennung der Polybuffer direkt auf eine mit 10mM Kaliumphosphatpuffer Ph7 äquilibrierte Poly-U-Sepharose-Säule aufgepumpt (10 ml Gel, Säulendurchmesser 9 mm, Pumpgeschwindigkeit 5 ml/h). Die Elution der Säule erfolgte durch einen linearen Phosphatgradienten von 10 mM nach 300 mM (10 - Säulenvolumina). Die Endopeptidase-haltigen Fraktionen (21 ml) wurden mit 150 mM KCl versetzt und zur Abtrennung der restlichen löslichen Transglykosylase über eine anti LT-IGg-Sepharose-Säule gepumpt. Der Durchlauf (25 ml), reine Penicillin-insensitive Endopeptidase, wurde durch Ultrafiltration durch YM-10 Membranen auf 3ml konzentriert.

c) Reinheitsbestimmung der Endopeptidase

Abb. 10: Analyse verschiedener Reinigungschritte bei der Reinigung der Endopeptidase mit SDS-Acrylamidgelektrophorese (Gradienten Gel 8-18% Acrylamid nach Morrissey (105) mit Silber gefärbt).



Auf ein SDS-Polyacrylamid-Gradienten-Gel wurden die Proteine nach den jeweiligen Reinigungsschritten aufgetragen. Die Proteine wurden nach Auftrennung mit Silber gefärbt (105, Material und Methoden). Vom Eluat der anti-LT-Igg-Sepharose wurden 0,7ug, der Poly-U-Sepharose lug; der Chromatofocusing-Säule 3ug, derDEAE-Sepharose 8ug, der CM-Sephrose 35ug und vom Rohextrakt 300 ug Protein aufgetragen.

Reinigungstabelle einer Endopeptidaseaufarbeitung aus 560

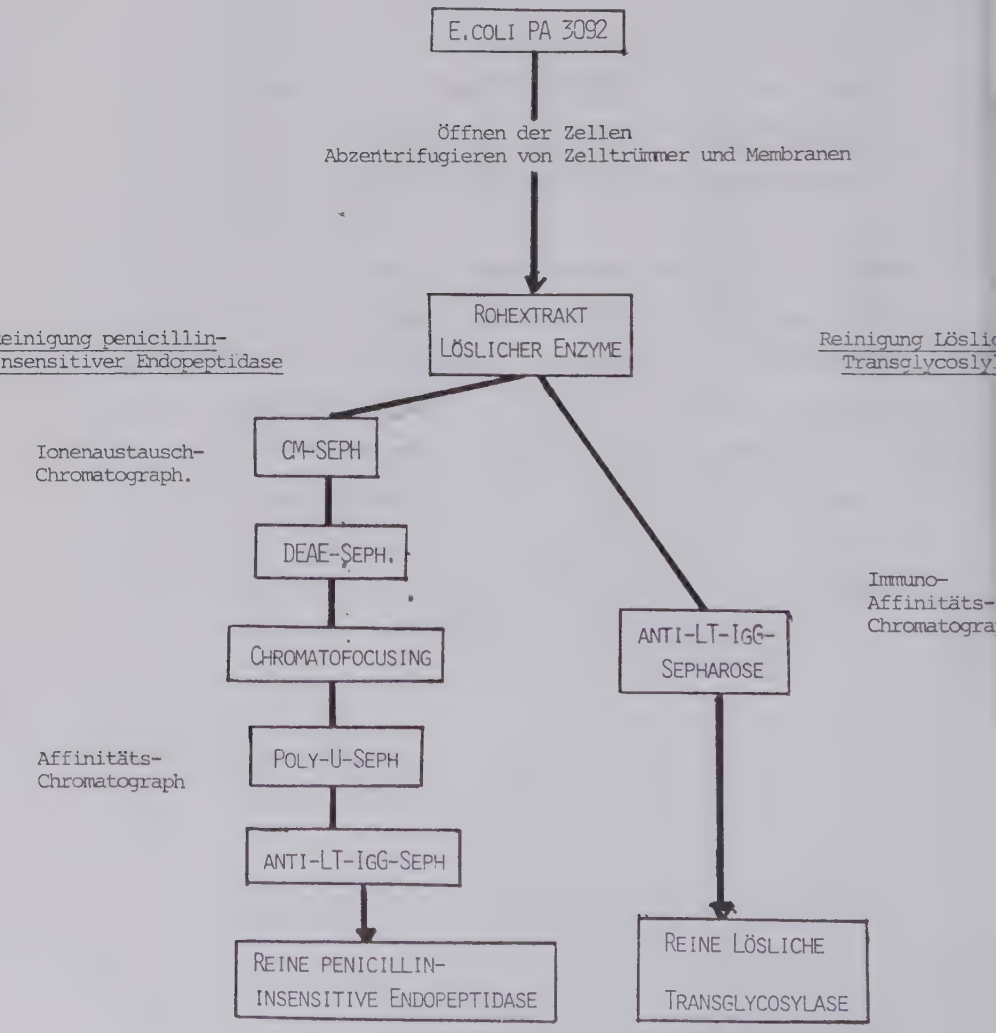
Gramm (Feuchtgewicht) E.Coli PA 3092

Reinigungsschritt	Gesamtprotein	Gesamtaktivität	Spez. Aktivität	Reinigungsfaktor	Ausbeute
Rohextrakt	53350 mg	1067 000E	20 E/mg	1	100%
Eluat CM-Sepharose	1105 mg	1576 840E	1427 E/mg	71	148%
Eluat DEAE-Sepharose	92 mg	1627 390E	17690 E/mg	881	152%
Eluat Chromatofocusing	8.8mg	1131 240E	128550 E/mg	6430	106%
Eluat Poly-U-Sepharose	2.64mg	1262 370E	478170 E/mg	23900	118%
Durchl. anti-LT-IgG-Seph.	413 ug	356 540E	863300 E/mg	43170	33,5%

Die Enzymaktivität wurde im Standardenzymtest ermittelt (S. 22.) 1 Endopeptidaseeinheit entspricht dabei der Spaltung von 1 p mol C_3 in 1 Minute bei 37° C.

Beim letzten Reinigungsschritt nimmt die Aktivität der Penicillin insensitiven Endopeptidase stark ab. In reinem Zustand ist das Enzym sehr instabil, in Gegenwart anderer Proteine dagegen relativ stabil. Offensichtlich wird das Enzym durch andere Proteine stabilisiert. Möglicherweise spielt dabei die lösliche Transglykosylase, die erst beim letzten Reinigungsschritt entfernt wird, eine besondere Rolle. Sowohl Penicillin insensitive Endopeptidase als auch lösliche Transglykosylase sind im Rohextrakt stark gehemmt (siehe Enzymreinigungen,12,78,79,80). Für beide Enzyme und viele Penicillinbinde-Proteine konnten Wechselwirkungen mit Polynukleotiden, DNS, insbesondere Einzelstrang-DNS, und Polymeren mit vielen geladenen Gruppen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß diese am Mureinmetabolismus beteiligten Enzyme ähnliche Bereiche im Molekül haben. Die Wechselwirkungen mit DNS, dem Murein, ebenfalls ein Polymeres mit vielen geladenen Gruppen, und vielen Säulenmaterialien könnten in diesem Bereich des jeweiligen Enzymmoleküls stattfinden. Dadurch könnte auch das ähnliche Verhalten von Penicillin insensitiver Endopeptidase und löslicher Transglykosylase bei der Enzymreinigung erklärt werden (12).

REINIGUNGSSCHEMA FÜR LOSLICHE
TRANSGLYCOSYLASE UND ENDOPEPTIDASE



3. Antikörper gegen Penicillin-insensitive Endopeptidase

Mit der reinen Endopeptidase war es möglich, Hasen zu immunisieren und Antikörper gegen das Enzym zu isolieren. Mit spezifischen Antikörpern kann man a. die enzymatische Aktivität der Endopeptidase hemmen (siehe Abb. 13) und so den Einfluß der Endopeptidaseaktivität auf andere Enzyme untersuchen und b. Endopeptidase über Immunoaffinitätschromatographie anreichern (siehe 4. b). Von der reinen Endopeptidase wurden zunächst 80 ug in der schon beschriebenen Weise (Seite Material und Methoden) in einen Hasen gespritzt. Der Nachweis von Antikörpern erfolgte durch Mikro-Ouchterlony-Doppeldiffusionstests und einem ELISA-Test kombiniert mit "Proteinplotting".

a. Nachweis der Spezifität der Antikörper

Mikro-Ouchterlony-Doppeldiffusionstest

Mit dieser außerordentlich empfindlichen Methode konnten im Rohextrakt (siehe Reinigungstabelle für Penicillin-insensitive Endopeptidase) noch bis zu einer Verdünnung von 1:256 deutliche Anti-Endopeptidase/Endopeptidase-Präzipitate nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum angereicherten Enzympräparat sind im Rohextrakt 2 Präzipitationslinien zu erkennen (Abbildung 11A). Möglicherweise gibt es eine Kreuzreaktion mit einem Protein, das bei der Reinigung abgetrennt wurde oder ein Aggregat, das Endopeptidase enthält.

Abbildung 11A: Mikro Ouchterlony-Doppeldiffusionstest mit Rohextrakt als Antigen bis 1:512 verdünnt

11B: dto mit Eluat von 1. Reinigungsstufe (CM Pool) als Antigen bis 1:128 verdünnt.

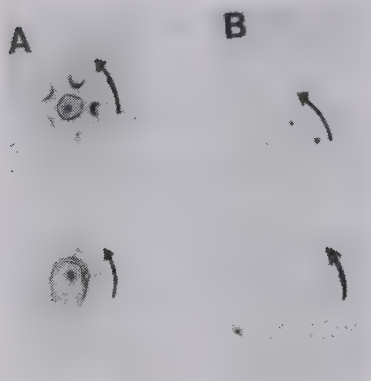


Abb.A: oben: Rohextrakt v. unverdünnt (Pfeil) bis 1:16 verdünnt. Orientierung entgegen den Uhrzeigersinn.
unten: Rohextrakt 1:32 - Pfeil - 1:512 verdünnt

Abb. B: oben: Eluat von CM Sepharose (Seite) von 1:32 (Pfeil) bis 1:12 gleiche Orientierung
unten: Eluat von CM Sepharose vo unverdünnt (Pfeil) bis 1:16 verdünnt

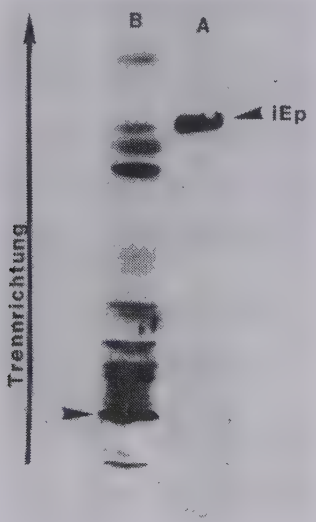
In die Zentralbohrung der Auftragsschablone wurden jeweils 20 ul Antiserum, in die anderen Verdünnungen des Antigens in PBS von 1:1, 1:2, 1:4 bis 1:512 gefüllt. Um ein gutes Präzipitat zu ereichen, war es notwendig, das unverdünnte Antiserum gegen Verdünnungsstufen von Antigen diffundieren zu lassen (113). Nach zwei Tagen wurden die Präzipitationslinien mit Coomassie Brillant-Blau gefärbt (Material und Methoden).

Reaktion der Antikörper mit auf Zellulosenitrat-Filter transferierten Proteinen

Das Prinzip dieses Nachweises wurde in Material und Methoden bereits beschrieben. In einer stark angereicherten Enzympräparation (Abb. 12B, Spalte A) zeigt ausschließlich die Penicillin-insensitive Endopeptidase eine Reaktion mit den anti Endopeptidase-Antikörpern. Somit stand nun ein Antikörper zur Verfügung, der spezifisch mit Penicillin insensitiver Endopetidase reagierte.Bei Proteinen, die bei Dialyse des Rohextrakts vor der ersten Reinigungstufe ausgefallen waren (Abb. 12, Spalte B), war eine Reaktion mit einem Protein (siehe Pfeil) von einem

Molekulargewicht größer als 90,000D festellbar. Bei diesem Protein handelt es sich möglicherweise um ein Endopeptidase enthaltendendes Aggregat, eine Endopeptidase-Vorstufe oder um ein Protein (eventuell eine weitere Endopeptidase), das mit den Antikörpern kreuzreagiert. Bei den anderen in Abb. 12A sichtbaren Banden handelt es sich um unspezifische Reaktionen des Hasenserums mit E.coli-Proteinen, die in konzentrierten Seren sehr häufig (weniger als 1:25 verdünnt) auftreten (119).

Abb. 12: Nachweis der Spezifität der Antikörper

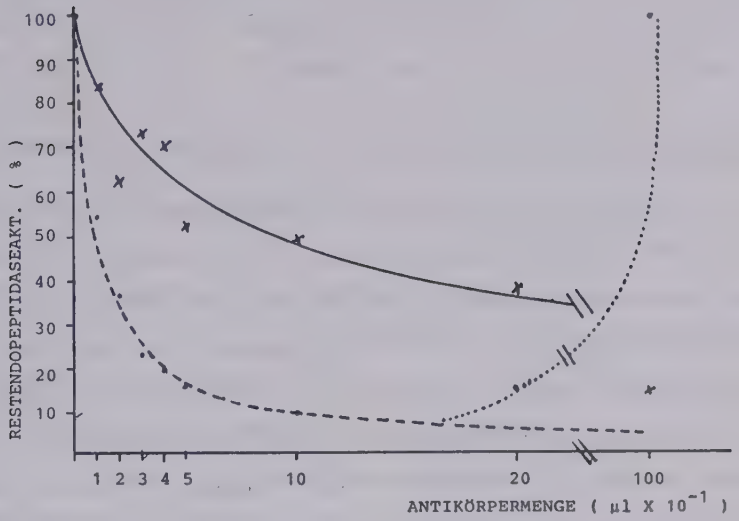


Legende zu Abb. 12: 100 ul einer stark angereicherten Enzympräparation (DEAE Pool siehe Abb. 10 - Endopetidasereinigung) wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10%) aufgegeben. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf ein Zellulosenitratfilter übertragen. Spezifische Antigen/Antikörper-Komplexe wurden in der schon beschriebenen Weise über die Peroxidase-Reaktion sichtbar gemacht.Spalte A: DEAE-Pool; Spalte B: Proteine, die bei der Dialyse des Rohextrates vor der 1. Reinigungsstufe ausgefallen waren (siehe Epase-Reinigung, Seite 43).. -- durch Pfeil ist die Position der Endopeptidase gekennzeichnet.

b. Hemmung der enzymatischen Aktivtät der Endopeptidase mit Antikörpern.

Die Aktivität der Penicillin insensitiven Endopeptidase wird von anti Epase Antikörpern spezifisch gehemmt. In komplettem Serum reicht bereits eine 0,5-1 ug IgG entsprechende Menge aus, um die Endopeptidase zu 50% zu hemmen. Von isoliertem anti Ep IgG werden 2,5-6 ug benötigt, um die gleiche Hemmwirkung zu erzielen (Abb.13). Die im Serum anwesenden zusätzlichen Immunglobuline (IgM, IgA, IgE...) dürften für die bessere Hemmwirkung des Serums verantwortlich sein. Eine im Serum vorhandene Mureinhydrolase (Amidase) täuscht bei höheren Serumkonzentrationen Endopeptidaseaktivität vor (Abb.13). Da lösliche Transglykosylase von anti Endopeptidase Antikörpern nicht beeinflußt wird, kann man die Endopeptidase in Transglykosylase-haltigen Enzympräparationen spezifisch hemmen. Dadurch kann in solchen Enzympräparationen der Einfluß der Endopeptidase auf die LT untersucht werden (siehe II.A 3 und II.B 1).

Abb. 13: Hemmung der Endopeptidase durch Antikörper



Legende zu Abb.13: 5ul einer Endopeptidasepräparation (DEAE Pool 4ug spez. Akt. 18000 E/mg) wurden mit ansteigenden Antiserum bzw anti Ep IgG Konzentrationen vesetzt und die Endopeptidaseaktivität gemessen. Das anti Endopeptidase IgG war über Protein A-Sepharose Affinitäts-chromatographie isoliert worden (Proteingehalt 5,5 ug/ml). Die zugegebene Antikörpermenge variierte von 5 ul 1:50 verdünnt bis 10 ul unverdünnt - also von Faktor 1 bis 100 (dies entspricht bei IgG 0,55-55 ug).

4. Verbesserte Methoden zur Reinigung der Penicillin insensitiven Endopeptidase

Durch Kombination von Ionenaustausch-und Affinitätschromatographie konnte die Penicillin-insensitive Endopeptidase mehrmals sehr rein isoliert werden. Die Ausbeute aus 500-600 Gramm Zellen war dabei aber mit maximal 400 ug reinen Proteins ausgesprochen gering. Für die Reinigung größerer Endopeptidasemengen (1mg oder mehr) ist daher eine Verbesserung der Reinigungsmethode erforderlich. Die Reinigung des Enzyms über Affinitätschromatographie beispielsweise an Murein oder über Antikörper wäre eine erhebliche Verbesserung der bishe-

rigen Methode. Erst mit reinem Enzym konnten spezifische Antikörper isoliert und Wechselwirkungen des Enzyms mit Mureinsacculi genauer untersucht werden.

a. Affinität der Penicillin insensitiven Epase zu Murein

Es ist möglich, die Affinität der Endopeptidase zu Murein aus E. coli W7 (Amylase-verdaute Sacculi) zur Reinigung des Enzyms auszunutzen. Inkubiert man das Enzym mit Mureinsacculi, so bindet die Endopeptidase über hydrophile Wechselwirkungen an das Murein. Durch Erhöhen der Ionenstärke kann die Endopeptidase ohne Aktivitätsverlust wieder vom Murein eluiert werden (Tabelle 1). Affinitätschromatographie an Murein wäre daher ein guter Reinigungsschritt für die Penicillin-insensitive Endopeptidase.

Tabelle 1: Verteilung der Endopeptidaseaktivitäten.

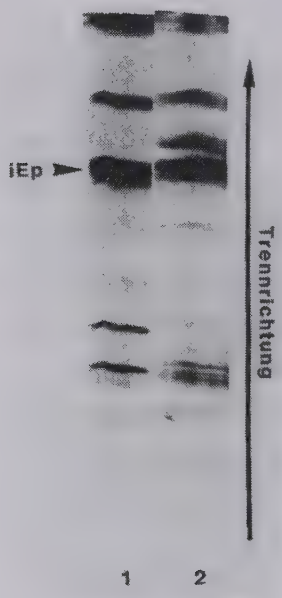
	Gesamtaktivität	Anteil von Gesamtenzymmenge (%)
zugegebenes Enzym	263 E	100
Überstand	71 E	27
Waschflüssigkeit	29 E	11
Eluat	327 E	125

75 ug Murein-Sacculi (W7 Sacculi Amylase verdaut) wurden mit 150 ul Penicillin-insensitiver Endopeptidase 30 min bei 4°C inkubiert. Die Murein-Sacculi wurden in einer Beckman Airfuge bei 100 000 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und einmal mit 175 ul Puffer (Tris/Maleat 10 mM, pH 6,8, + 10 mM $MgSO_4$, 0.1 mM DTE, 0,2 % Triton X-100, 0,02 NaN_3) gewaschen. Gebundene Endopeptidase wurde durch Inkubation mit 300 mM KCl im Waschpuffer (175 ul, 30 min, 4°C) eluiert. Im Eluat, Waschpuffer und Überstand wurde die Endopeptidaseaktivität bestimmt(Mat.u.Meth.).

b. Vorversuche zur Reinigung der Penicillin-insensitiven Endopeptidase über Affinitätschromatographie an Antikörpern.

Anti Ep IgG wurde in der schon beschriebenen Weise an aktivierte Sepharose-4B gekoppelt. Auf eine Säule mit 2,5 ml anti-Ep-IgG-Sepharose (Ø 0,7 cm Gelbetthöhe 6,5 cm Pumpgeschw. 10 ml/h) wurden 40 ml gegen Puffer A dialysierter Rohextrakt (aus 17 Gramm E. Coli 3092) aufgepumpt; mit Puffer A wurde die Säule intensiv gewaschen. Im Durchlauf war konstant noch 20-30% der im Rohextrakt gemessenen Endopetidaseaktivität nachweisbar, die Kapazität der Säule war also noch nicht erschöpft. Mit einem linearen $MgCl_2$-Gradienten von 100 mM-1M in Puffer A eluierte das Enzym mit hoher Ausbeute und hoher spezifischer Aktivität. Die Bindung der Endopetidase an das Immunadsorbens war relativ schwach, schon mit 2 molar Harnstoff oder 0,5 molar $MgCl_2$ konnte das Enzym eluiert werden. Lösliche Transglykosylase wurde nur in sehr geringen Mengen - weniger als 1% der im Rohextrakt meßbaren Transglykosylaseaktivität - an dieses Material gebunden.

Abbildung 14: Elution von Penicillin-insensitiver Endopeptidase mit Magnesiumchlorid von anti Ep IgG-Sepharose.



Legende: Auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel wurden verschiedene Eluatfraktionen einer anti-Ep-IgG-Sepharose aufgetragen. Die Proteine wurden nach Morissey mit Silber gefärbt.

Bahn 1: Eluat mit 3M $MgCl_2$ 1,3 ml gefällt mit 10% TCA
Bahn 2: Eluat mit 0,5 M $MgCl_2$ 1,3 ml gefällt mit 10% TCA

Die Endopetidase kann (Abb.14) durch die Immunoaffinitätschromatographie direkt aus Rohextrakt stark angereichert werden. Im Eluat der Immunoaffinitätssäule kann eine erheblich höhere Gesamtendopetidaseaktivität als im Rohextrakt nachgewiesen werden (bis zu 200%). Die Endopeptidase ist im Rohextrakt, wie auch schon früher nachgewiesen wurde, stark gehemmt (12). Daher können Ausbeuten von mehr als 100% erzielt werden.

5. Abschätzung der Kopienzahl von Penicillin-insensitiver Endopeptidase in der Zelle

Man kann aus der Enzymanreicherung die Kopienzahl der Penicillin-insensitiven Endopeptidase in der Zelle berechnen. Dabei ergibt sich bei einer Ausgangszellmenge von 2×10^{14} Bakterien, 400 ug Ausbeute und einem Molekulargewicht von 31 000 D eine Kopienzahl von 35 Molekülen iEp pro Zelle. Berücksichtigt man, daß nicht alle Zellen geöffnet wurden, und daß bei der Enzymreinigung gewisse Verluste unvermeidbar sind, so dürfte die wahre Kopienzahl zwischen 50 und 100 Molekülen pro Zelle liegen. Die Kopienzahl der Endopeptidase ist so gering, daß sie wahrscheinlich nur über ganz bestimmte Bereiche der Zelle, eventuell in der Zellmitte (siehe Diskussion), verteilt ist. Möglicherweise hat das Enzym Regulatorfunktion und reguliert in einem bestimmten Bereich der Zelle die Aktivität anderer Mureinhydrolasen, beispielsweise der löslichen Transglykosylase (siehe Teil II). Die Kopienzahl der löslichen Transglykosylase ist schätzungsweise 10-20mal höher als die der Endopeptidase. Ein über den gesamten Zellzyklus stabiler Komplex zwischen löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopeptidase ist daher unwahrscheinlich.

II. Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopetidase.

A: Versuche zum Nachweis eines Komplexes zwischen beiden Enzymen

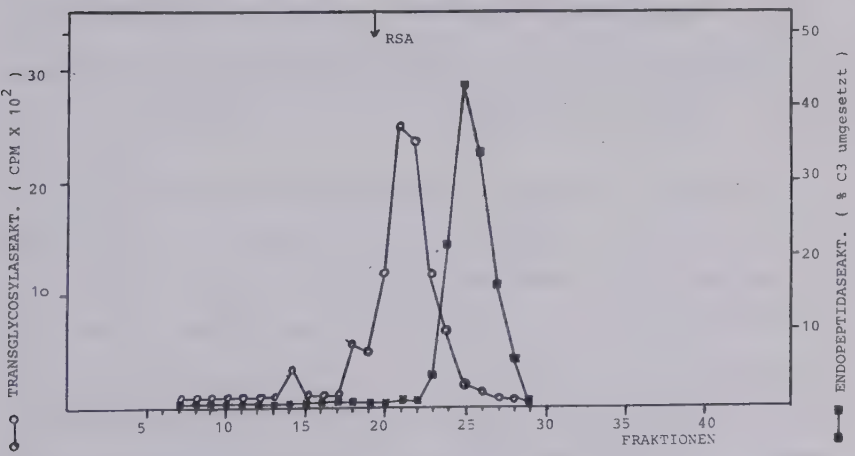
1. Auswahl geeigneter Methoden zum Nachweis von Enzym-Komplexen.

Viele Methoden, mit denen bei anderen Enzymen erfolgreich Multienzymkomplexe nachgewiesen worden sind, konnten bei löslicher Transglykosylase und Penicillin insensitiver Endopeptidase nicht angewandt werden(115-127,12). Die Gründe dafür sind: Beide Enzyme sind sehr labil, nur in geringen Mengen verfügbar und sie neigen zu hydrophilen Wechselwirkungen mit hochpolymeren Trägermaterialien. In Vorversuchen konnten nach Gel-Filtration und Sucrose-Gradienten-Zentrifugation beide Enzymaktivitäten jeweils in scharfen Gipfeln gemessen werden. Daher wurde versucht zunächst Komplexe zwischen den Enzymen mit diesen Methoden nachzuweisen. Dann erst sollte mit bifunktionellen Quervernetzungsreagentien ein Komplex zwischen Transglykosylase und Endopeptidase schlüssig bewiesen werden.

2. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Penicillin insensitiver Endopeptidase und löslicher Transglykosylase mit Gelfiltration.

In Vorversuchen wurde das Laufverhalten der isolierten Enzyme bestimmt. Hydrophile Wechselwirkungen der Enzyme mit dem Trägermaterial wurden durch Zugabe von 50 mM KCl zum Puffer unterdrückt. Beide Enzyme eluierten in scharfen Peaks, jedoch im Vergleich zu den Testproteinen verzögert. Existiert ein Komplex zwischen Penicillin insensitiver Endopeptidase und löslicher Transglykosylase so ist bei der Gelfiltration von Endopeptidase in Gegenwart von Transglykosylase eine Änderung des Laufverhaltens beider Enzyme zu erwarten. (zusätzliche gemeinsame Aktivitätspeaks,"Schmieren"der Enzymaktivitäten).

Abbildung 15: Gelfiltration von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Epase



Je 0,25 ml LT und iEp wurden 2 h bei 4°C inkubiert und auf eine G75-SF Sepharose-Säule aufgepumpt (Säulendurchmesser 1 cm, Gelbetthöhe 50 cm, Pumpgeschwindigkeit 2 ml/h, Fraktionen 1 ml, Elutionspuffer Tris Maleat 10 mM, pH 6,8, + 50 mM KCl + 10 mM $MgSO_4$, 0,1 mM DTE, 0,02 % NaN_3). Zusammen mit den Enzymen wurde 1 mg RSA als internes Standardprotein aufgetragen (Pfeil).

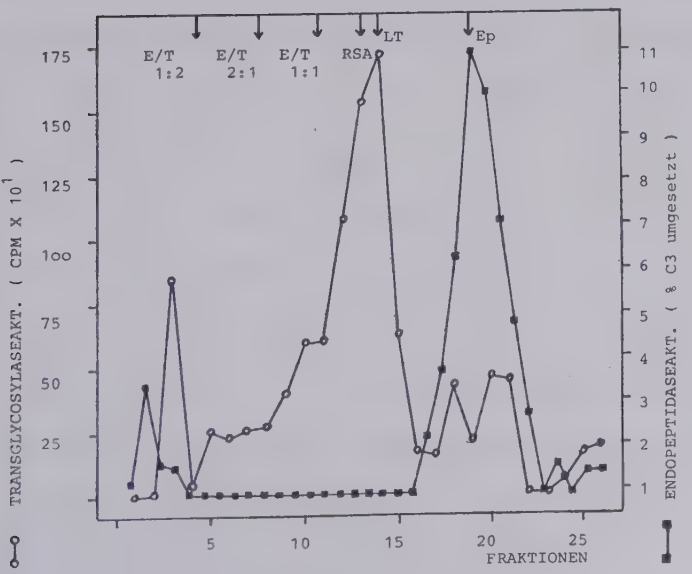
Das Laufverhalten beider Enzyme im Gemisch hat sich, verglichen mit dem der isolierten Enzyme, nicht verändert (Abb. 15). Auch bei der Gelfiltration von wenig angereicherten Enzympräparationen (siehe Reinigungstabelle iEp - Eluat einer CM-Sepharose) waren nur 2 getrennte Aktivitätspeaks zu erkennen. Es waren weder zusätzliche Enzympeaks noch ein Schmieren der Enzymaktivitäten feststellbar. Mit Hilfe der Gelfiltration lassen sich also unter diesen Bedingungen keine Hinweise auf die Existenz eines Komplexes zwischen beiden Enzymen finden. Ein sehr schwacher Komplex könnte jedoch durch eventuelle Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial oder 50 mM Puffer zerstört werden; daher wurde versucht mit der Sucrose-Gradienten-Zentrifugation Wechselwirkungen zwischen beiden Enzymen nachzuweisen. Bei dieser Methode lassen sich die erwähnten potentiellen Störfaktoren vermeiden.

3. Sedimentationsverhalten der löslichen Transglykosylase in Gegenwart von Penicillin-insensitiver Endopeptidase bei der Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

In Vorversuchen wurden die Laufbedingungen ermittelt, bei denen beide Enzyme gut getrennt werden konnten und bei denen die Enzyme stabil waren. Dabei erwies sich ein Sucrose-Gradient von 5-20% in Tris/Maleat-Puffer (20 mM, 20 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DTE, 0,4 % Triton X-100, 0,04 % NaN_3) und eine Laufzeit von 25 Stunden bei 40 000 UPM in einem Beckman SW56-Rotor als optimal. Die isolierten Enzyme wurden gut getrennt und der Transglykosylase-Peak war weit genug vom Ende des Gradienten entfernt, um noch verschiedene Endopeptidase/Transglykosylase-Komplexe nachweisen zu können.

Das Sedimentationsverhalten von Rinderserumalbumin und löslicher Transglykosylase war nahezu identisch (MW: RSA 67 000 D/LT 65 000 D). Bei löslicher Transglykosylase waren oft im höhermolekularen Bereich weitere Aktivitätsgipfel nachweisbar; dabei handelt es sich möglicherweise um Aggregate aus mehreren Transglykosylasemolekülen. Bei reiner Endopeptidase war nach der Gradienten-Zentrifugation, vermutlich durch die nicht unerhebliche Verdünnung des Enzyms, eine sehr deutliche Aktivitätsminderung feststellbar (nur noch maximal 24 % Umsatz in 60 Min.).

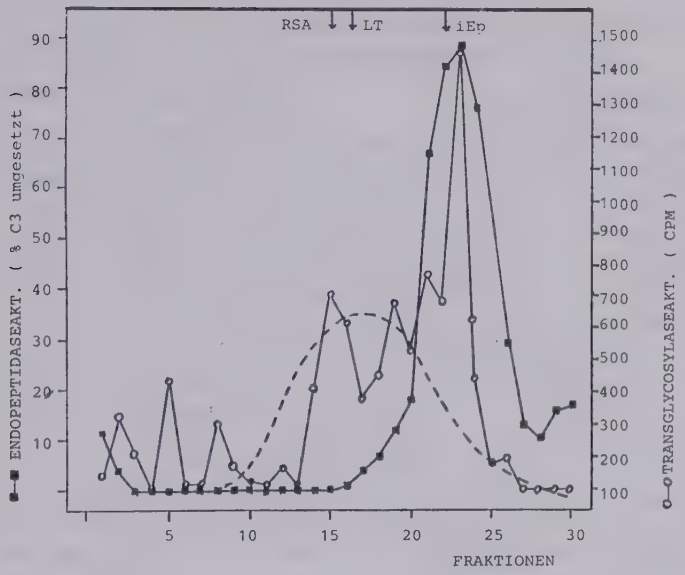
Abb. 16: Sedimentationsverhalten von reiner Transglykosylase in Gegenwart von Endopeptidase



Legende zu Abb. 16: 50 ul reine LT (130 Einheiten) und 100 ul reine Epase (60-100 Einheiten) wurden 60 Min bei 4°C vorinkubiert und auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen (4,3 ml, 5-20% Sucrose in Tris/Maleat 20 mM, pH 5,2, + 20 mM $MgCl_2$, 0,4 % Triton X-100, 0,2 mM DTE, 0,04 % NaN_3, Fraktionen jeweils 6 Tropfen). Laufzeit 25 h bei 40 000 UPM in einem Beckman SW56-Rotor. Positionen möglicher Endopeptidase/Transglykosylase-Komplexe, sowie die Positionen der reinen Enzyme und RSA sind durch Pfeile gekennzeichnet.
E/T 1:1 (31 000 D + 65 000 D = 96 000 D)
E/T 2:1 (2x31 000 D + 65 000 D = 127 000 D)
E/T 1:2 (31 000 D + 2x65 000 D = 161 000 D)

Bei der Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation von reiner löslicher Transglykosylase in Gegenwart von reiner Penicillin insensitiver Endopeptidase und auch bei der Wiederholung der Experimente mit anderen Puffern, ergaben sich keinerlei Hinweise auf einen Komplex zwischen den beiden reinen Enzymen. Jedoch war die Aktivität der Endopeptidase nach der Gradientenzentrifugation so gering, daß möglicherweise zusätzliche Aktivitätsgipfel nicht zu erkennen waren. Daher wurden auch Experimente mit angereicherten Enzympräparationen, bei denen auch nach der Gradientenzentrifugation noch sehr hohe Endopeptidaseaktivität nachweisbar war (mehr als 90 % Umsatz in 60 Min), durchgeführt.

Abb. 17: Sucrose-Gradienten-Zentrifugation einer angereicherten Enzympräpration



100 ul der angereicherten Enzympräparation (CF-Eluat - siehe Epase-Reinigung 500 Einh., spez.Akt. 129 00 E/mg) wurden auf den Sucrose-Gradienten aufgetragen. Laufbedingungen wie in Abb. 17.

Man findet Endopeptidaseaktivität nur in einem einzigen Gipfel. Bei der Transglykosylase jedoch findet man mehrere Aktivitätsgipfel, wobei die höchste Transglykosylaseaktivität im Endopeptidasegipfel ist. Dies ist aber keineswegs auf die Existenz eines Komplexes zurückzuführen, da ein solcher ein vollkommen anderes Sedimentationsverhalten zeigen müßte. Wahrscheinlich ist diese hohe Transglykosylaseaktivität im Endopeptidase-Peak auf die Stimulierung einer geringen Menge an Transglykosylase, die in den Endopeptidase-Peak schmiert, zurückzuführen (gestrichelte Linie = geschätztes Sedimentationsverhalten der LT). Bei Hemmung der Endopeptidaseaktivität durch spezifische Antikörper war dieser zusätzliche Aktivitäts-Peak der Transglykosylase stark reduziert. Auch bei

Experimenten mit Rohextrakt ergaben sich keinerlei Hinweise auf einen Komplex zwischen diesen Enzymen.

4. Zusammenfassung

Weder mit Gelfiltration noch mit Sucrose-Gradientenzentrifugation konnte ein Komplex zwischen den beiden Enzymen nachgewiesen werden.Dennoch könnte in der intakten Zelle ein solcher Komplex durchaus vorhanden sein. Schon beim Aufbrechen der Zellen, bei der Zentrifugation und bei der Dialyse des Rohextraktes können Strukturen oder Co-Faktoren verloren gehen, die zur Bildung eines Komplexes nötig sind. Möglicherweise ist der Komplex so instabil, daß er unter den experimentellen Bedingungen unter denen die Gel-Filtrationen und die Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugationen durchgeführt wurden nicht mehr beständig ist. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da die Experimente unter schonendsten Bedingungen durchgeführt wurden. Offensichtlich wird aber die Transglykosylaseaktivität durch hohe Endopeptidaseaktivität stimuliert (Abb. 17). Dies deutet auf eine mögliche Zusammenarbeit beider Enzyme hin. Dieses Zusammenwirken wurde in weiteren Experimenten genauer untersucht.

B. Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopeptidase

Es wurde versucht Hinweise auf eine Stimulierung von LT durch die Aktivität der iEp durch geeignete Experimente zu bestätigen und den Mechanismus der Stimulierung zu untersuchen. Eine Aktivierung durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung schien nach den bisherigen Ergebnissen unwahrscheinlich. Da beide Enzyme am gleichen Substrat, dem Murein-Sacculus, angreifen, könnte eine Stimulierung durch Veränderung der

Mureinstruktur zustande kommen.

1. Stimulierung der Transglykosylase-Aktivität durch Endopeptidase-Aktivität

In einer Enzympräparation, die beide Enzyme enthielt (Eluat einer Chromatofocusing-Säule, spez. Akt. 130000 E/mg, siehe Endopeptidasereinigung), wurde die Endopeptidase durch Vorinkubation mit anti Ep IgG (60 Min bei 4°C) spezifisch gehemmt. Der Einfluß der Endopeptidase-Hemmung auf die Aktivität der gleichfalls in diesem Pool anwesenden Transglykosylase wurde bestimmt. Zur Kontrolle wurde reine Transglykosylase in gleicher Weise behandelt und getestet. Die Ergebnisse des Versuchs zeigt Abbildung 18 B. Reine Transglykosylase wird durch anti Ep IgG überhaupt nicht in seiner Aktivität beeinflußt, während die Transglykosylase-Aktivität in dieser Enzympräparation in Gegenwart von anti Ep IgG auf 1/3 der ursprünglichen Aktivität sinkt. Der gleiche Effekt trat auch bei Experimenten mit Rohextrakt auf, da beide Enzyme im Rohextrakt stark gehemmt sind, ist die Abnahme der Transglykosylaseaktivität dort viel geringer.

2. Endopeptidase-vorbehandelte Murein-Sacculi als Substrat für lösliche Transglykosylase

Eine Änderung der Transglykosylase-Aktivität als Folge von Strukturveränderungen im Substrat, dem Murein-Sacculus, wäre für die Bakterienzelle eine gute Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms zu regulieren. Daher sollte in diesen Experimenten untersucht werden, inwieweit die Endopeptidase-Aktivität durch Veränderung der Quervernetzung im Sacculus die Trans-

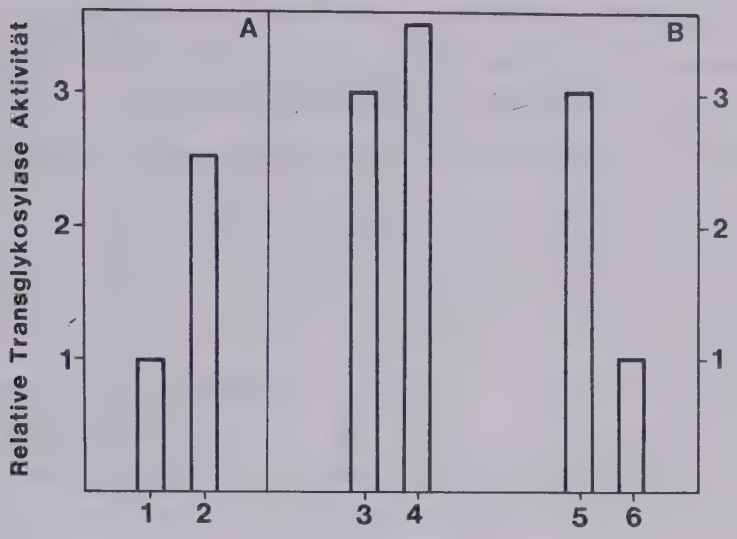
glykosylase-Aktivität beeinflussen kann. Sacculi wurden 23 Stunden mit reiner Endopeptidase vorinkubiert. Ein Teil wurde zur Inaktivierung der Endopeptidase gekocht. Anschließend wurde zu den Proben reine Transglykosylase zugefügt und deren Aktivität bestimmt. Zur Kontrolle wurden Mureinsacculi ohne Endopeptidase-Zusatz in gleicher Weise behandelt und der Einfluß reiner Transglykosylase auf diese Sacculi getestet.

Tabelle 2 : Reaktion der lösl. Transglykosylase mit Endopeptidase-vorbehandelten Sacculi auf Transglykosylase-Aktivität

Testansatz	Freigesetzte Radioaktivität (CPM)	Transglykosylaseakt. (% von Kontrolle)
Kontrolle (unbehandelte Sacculi + LT)	3 036	100
Epase-vorbehandelte Sacculi + LT	7 663	252
gekochte Epase-vorbehandelte Sacculi + LT	7 473	246

Nullwert unbehandelte Sacculi = 2322 CPM;
Nullwert Epase behandelte Sacculi = 2576 CPM
Sacculi wurden mit Endopeptidase vorverdaut: 400 ul ^{3}H-Dap Sacculi (0,5 mg/ml, 48000 CPM/10 ul) + 200 ul Endopeptidase (1000 Einh.) in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) + 600 ul Endopeptidase-Testpuffer 23 Stunden bei 37°C. Bei der Kontrolle wurde anstelle von Endopeptidase Kaliumphosphatpuffer zugefügt (100 mM, pH 7).
Um die Transglykosylase-Aktivität zu bestimmen wurden je 40 ul Sacculi + 10 ul Transglykosylase + 50 ul Testpuffer 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des Nullwerts wurden anstelle von Transglykosylase jeweils 10 ul Kaliumphosphat-Puffer (10 mM pH 7) zugefügt.

Abbildung 18: Steigerung der Transglykosylase-Aktivität durch Epase-Aktivität



(A) Transglykosylase-Aktivität mit 1 = unbehandelten 2 = Epase vorbehandelten Sacculi (Tab. 2); (B) Einfluß von anti Ep IgG auf Transglykosylase-Aktivität 3 und 4 bei reiner LT, 3 ohne, 4 mit IgG; 5 und 6 im CF Pool; 5 ohne, und 6 mit anti Ep IgG(siehe Teil II,B,1).

Transglykosylase setzt aus Endopeptidase-vorbehandelten Mureinsacculi eindeutig mehr Muropeptide frei als aus unbehandelten Sacculi(Tab.2,Abb.18A). Dabei ist diese erhöhte Transglykosylase-Aktivität nicht auf aktive Endopeptidase während der Transglykosylase Reaktion zurückzuführen.

3. Beziehung zwischen Änderung der Mureinstruktur/Quervernetzung und der erhöhten Transglykosylase-Aktivität

Vergleicht man Endopeptidase vorbehandelte Sacculi mit unbe-

handelten Sacculi so stellt man praktisch keine Änderung in der Quervernetzung oder im Muropeptidmuster fest (Abb. 19).

- In Sacculi bei denen das Lipoprotein durch Inkubation mit Pronase abgespalten wurde, verändert Penicillin insensitive Endopeptidase den Quervernetzungsgrad erheblich (8). Lipoprotein schützt Murein offensichtlich gegen die Penicillin insensitive Endopeptidase. - Nur bei den anhydro-Dimeren zeigen sich bei Lipoprotein-tragenden Sacculi zum Teil klare Unterschiede. Die anhydro-Muropeptide bilden in E.coli die Kettenenden, sie enstehen auch durch Einwirkung von Transglykosylase auf Murein. Von den beiden C3 anhydro-Formen ist die Hauptkomponente fast vollständig verschwunden und nur noch als leichte Schulter sichtbar(Abb. 19,20). Möglicherweise ist die Stimulierung der Transglykosylaseaktivität durch Endopeptidase auf eine spezifische Spaltung einer dieser zwei anhydro-Formen zurückzuführen. Daraus kann man auf eine gewisse Zusammenarbeit zwischen den beiden Enzymen schließen. Die Endopeptidase kann an den durch Transglykosylasewirkung entstandenen 1,6-anhydro-Muropeptiden am Murein angreifen und liefert so durch Spaltung der Peptidbrücken an den Kettenenden ein besseres Substrat für die Transglykosylase . Um diese Hinweise zu bestätigen, wurden die 1,6-anhydro-Dimeren, die durch Transglykosylasespaltung entstanden, mit den durch Chalaropsis Muramidase erzeugten reduzierenden Dimeren als Substrat für die Endopeptidase verglichen.

Abbildung 19 A: Analyse von unbehandelten Sacculi

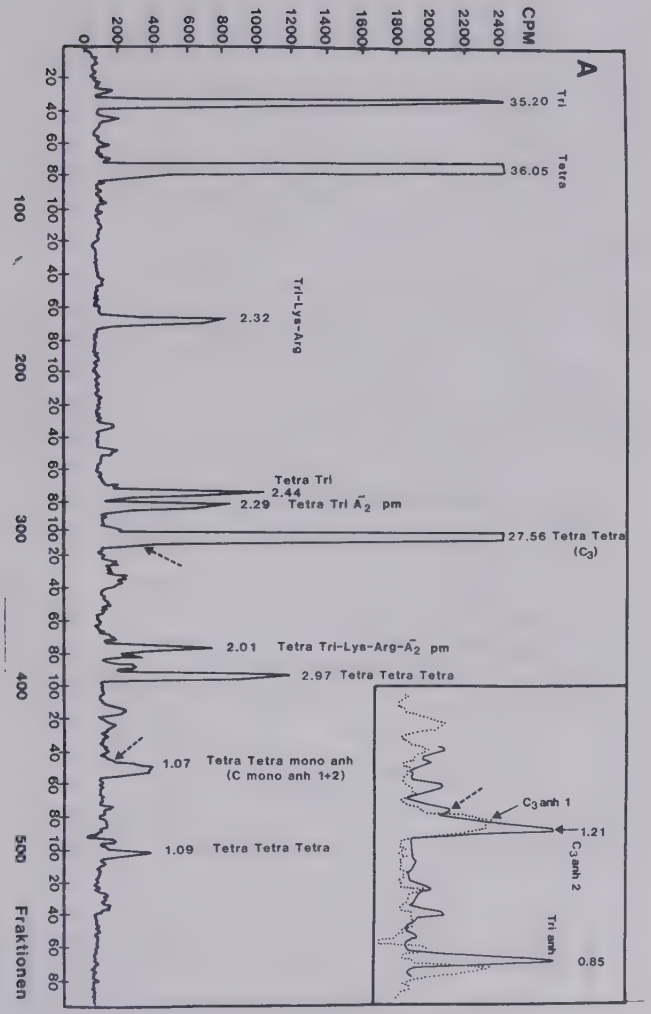
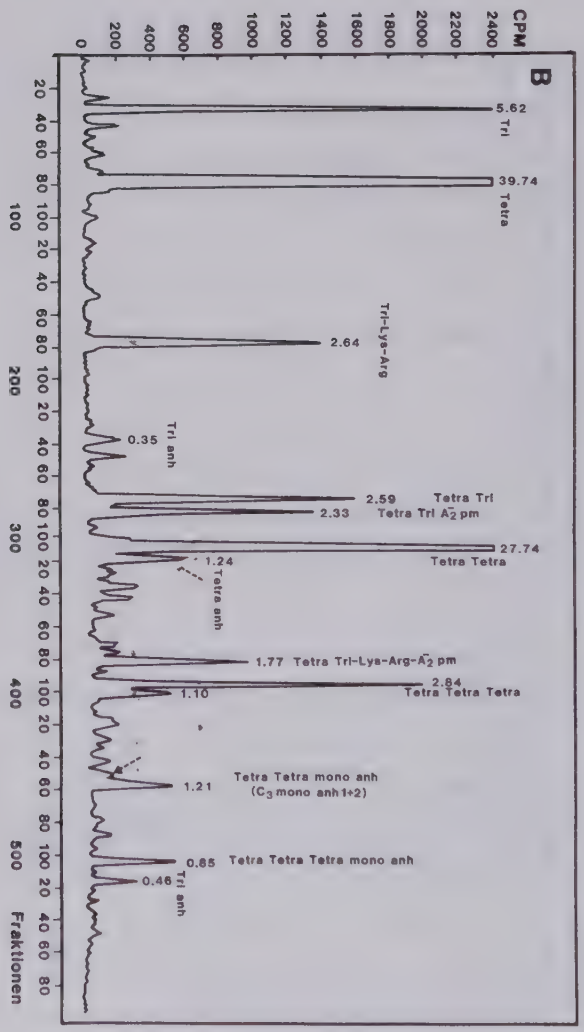
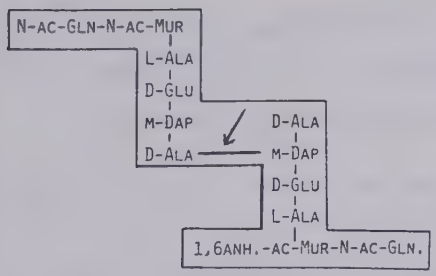


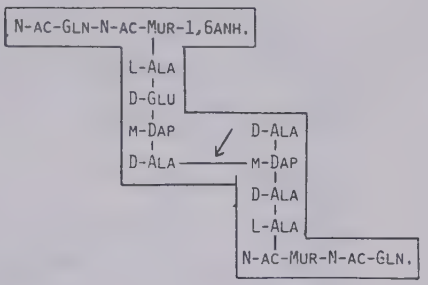
Abbildung 19 B: Analyse von Endopeptidase-behandelten Sacculi



Legende zu Abb. 19: Endopeptidase-behandelte und unbehandelte Mureinsacculi(je 400 ul siehe Tab. 2) wurden mit Chalaropsis-Muramidase (10ul,16h bei 37°C) verdaut. die Muropeptide wurden über HPLC analysiert(Mat.u.Meth.).
Laufbedingungen: 100 ul Probe (pH 4); 25 cm x 5 um, Merck-Säule; linearer pH/Methanol-Gradient in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 4,33-5,03, + 15 % Methanol; 53°C Säulentemperatur (siehe Material und Methoden).
Kennzeichnung der wichtigsten Muropeptide: Tri = Disaccharid Tripeptid; Tetra = Disaccharid Tetrapeptid; Tri-Lys-Arg = Disaccharid Tripeptid mit Lys, Arg, Rest von Lipoprotein; Tri-anh.(X) = Disaccharid Tripeptid mit 1,6-Anhydrobindung; Tetr-anh.(X´) = Disaccharid Tetrapeptid mit 1,6 Anhydrobindung; Tetra Tri-A_2pm = Dimeres Disaccharid Tetrapeptid über Dap-Dap Bindung quervernetzt; Tetra/Tri = Dimeres aus Disaccharid Tetra- und Tripeptid; Tetra Tetra Tetra = Trimeres aus 3 Disaccharid Tetrapeptiden; Tetra Tetra = Dimeres aus 2 Disaccharid Tetrapeptiden; Tetra Tri-Lys-Arg-A_2pm = Dimeres aus 2 Disaccharid Tetrapeptiden, wobei eines Lys/Arg vom Lipoprotein trägt; Tetra Tri A_2pm-anh. = gleich Dap/Dap, nur 1 Muraminsäure hat 1,6-Anhydrobindung; Tetra/Trianh. = Tetra/tri mit 1,6-Anhydrobindung an einer Muraminsäure; Tetra Tetra monoanh. 1 + 2 (C3 monoanh. 1 + 2) C3 mit 1,6-Anhydrobindung an einer Muraminsäure. Bei guter Auflösung kann es in 2 Formen aufgetrennt werden - Anhydrobindung entweder auf Donor- oder Akzeptorseite; Tetra Tetra Tetra monoanh. = Trimeres mit 1,6-Anhydrobindung an einer Muraminsäure.
An den Kettenenden befinden sich jeweils Muropeptide mit 1,6 Anhydro-Muraminsäure (siehe Einleitung Seite 3-5), diese kommen als Monomere, Dimere, Trimere, Tetra, Tri Peptide usw. vor. Vom Monoanhydro-Dimeren aus 2 Disaccharidtetrapeptideinheiten (C3 anhydro) sind 2 Formen möglich.

Abbildung 20: Struktur der beiden C3 monoanhydro-Formen





C3 anhydro-1 (Tetra Tetra anh.1) anhydro-Gruppe befindet sich auf der Akzeptorseite

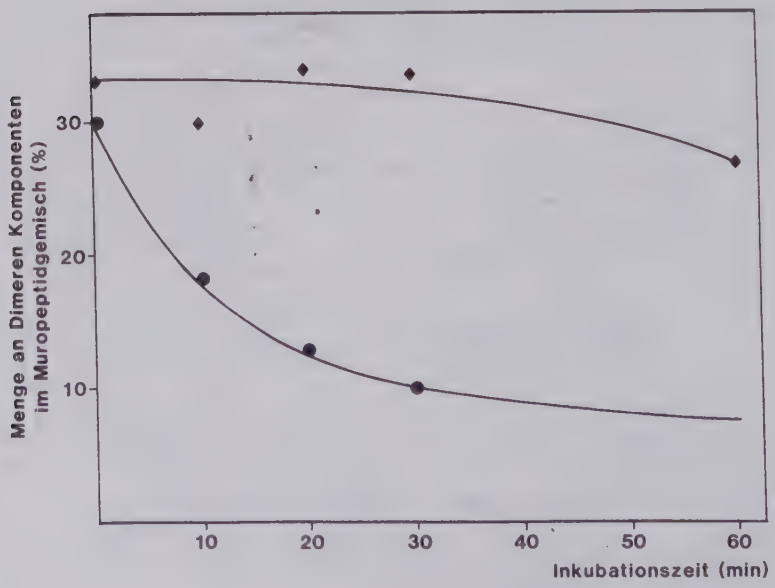
C3 anhydro-2 (Tetra Tetra anh.2) anhydro-Gruppe befindet sich auf Donorseite

Bei der Bildung von Petidbrücken wird die Bindungsenergie durch Abspaltung des endständigen D-Alanins einer Pentapeptid seitenkette gewonnen (Donor). Das endständige D-Alanin des Donor-Muropeptids bildet mit der Dap des benachbarten Muropeptids (Akzeptor) die Peptidbrücke.

4. Reduzierende dimere Muropeptide und 1,6-anhydro dimere Muropeptide als Substrat für Penicillin-insensitive Endopeptidase

Da die 1,6-anhydro-Komponenten im Murein nur in relativ geringen Mengen vorkommen (C3-anhydro 1-2 %), wurden diese durch Einwirkung von löslicher Transglykosylase auf isoliertes Murein in größeren Mengen hergestellt. Um die recht aufwendige Isolierung der einzelnen Komponenten zu umgehen und um die Reaktion der Endopeptidase mit möglichst vielen Komponenten gleichzeitig bestimmen zu können, wurde ein Gemisch sämtlicher Muropeptide für die Enzymtests verwendet.

Abbildung 21: Reduzierende und 1,6-anhydro Dimere als Substrat für Penicillin insensitive Endopeptidase (C3 und C3-dianhydro).



Legende zu Abb.21: Je 50 ul ^{3}H-Dap Sacculi (0,25 mg/ml Murein, 41 000 cpm/ul) wurden mit 10 ul löslicher Transglykosylase bzw. 10 ul Chalaropsis Muramidase und je 60 ul Puffer (Acetat 200 mM, pH 5,5; 0,4 % Triton X-100; 0,1 mM DTE; 0,04 % NaN_3 für LT und Kaliumphosphat 20 mM, pH 4,8 für Chalaropsis Muramidase) 16 Stunden bei 37°C verdaut. Die Enzyme wurden durch Kochen (5 Min) denaturiert und je 10 ul der Muropeptidmischungen mit Endopeptidase (je 3,2 Einheiten), bei 37 °C inkubiert.Nach Auftrennung über Papierchromatographie wurde die Menge der jeweiligen Dimeren Hauptkomponente (C3 und C3-dianhydro) bestimmt (Mat.u.Meth.).

◆—◆Einwirkung von Endopeptidase auf C3
●—●Einwirkung von Endopeptidase auf C3-dianhydro

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die 1,6-anhydro-dimeren Komponenten erheblich schneller als die reduzierenden Dimeren von Endopeptidase gespalten werden. Es entstehen also bei der Spaltung des Mureins mit löslicher Transglykosylase Reaktionsprodukte, die von Penicillin-insensitiver Endopeptidase wesentlich rascher gespalten werden als die reduzierenden Dimeren. Dies deutet darauf hin, daß die 1,6-anhydro Dimeren das eigentliche Substrat für die Penicillin-insensitive Endopeptidase sind.

III. Enzymatische Aktivitäten von Penicillin-insensitiver Endopeptidase und membrangebundener Endopeptidase (PBP 4) an quervernetzten Muropeptiden in komplexen Mischungen

In E. coli findet man mindestens 2 Enzyme, die Transglykosylase-Aktivität (lösliche und membrangebundene) und 2 Enzyme, die Endopeptidase-Aktivität haben (Penicillin-insensitive Endopeptidase und Penicillin-sensitive Endopeptidase - PBP4). Da man auch verschiedene quervernetzte Muropeptide (Ala/Dap-, Dap/Dap-Quervernetzung sowie Dimere mit Lipoprotein....) findet, ist es interessant, ob die Endopeptidasen jeweils unterschiedliche dimere Muropeptide angreifen. Beide Endopeptidasen waren in reinem Zustand verfügbar. Daher wurde die

Spaltung einzelner quervernetzter Komponenten in komplexen Muropeptidgemischen durch Penicillin-insensitive Endopeptidase bzw. PBP 4 untersucht. Daraus kann man Schlüsse auf die "unterschiedliche" Funktion der beiden Endopeptidasen bzw. Endopeptidase/Transglykosylase-Systeme ziehen.

Abb. 22A: Analyse reduzierender Muropeptide (Chalaropsis Muramidase) mit HPLC.

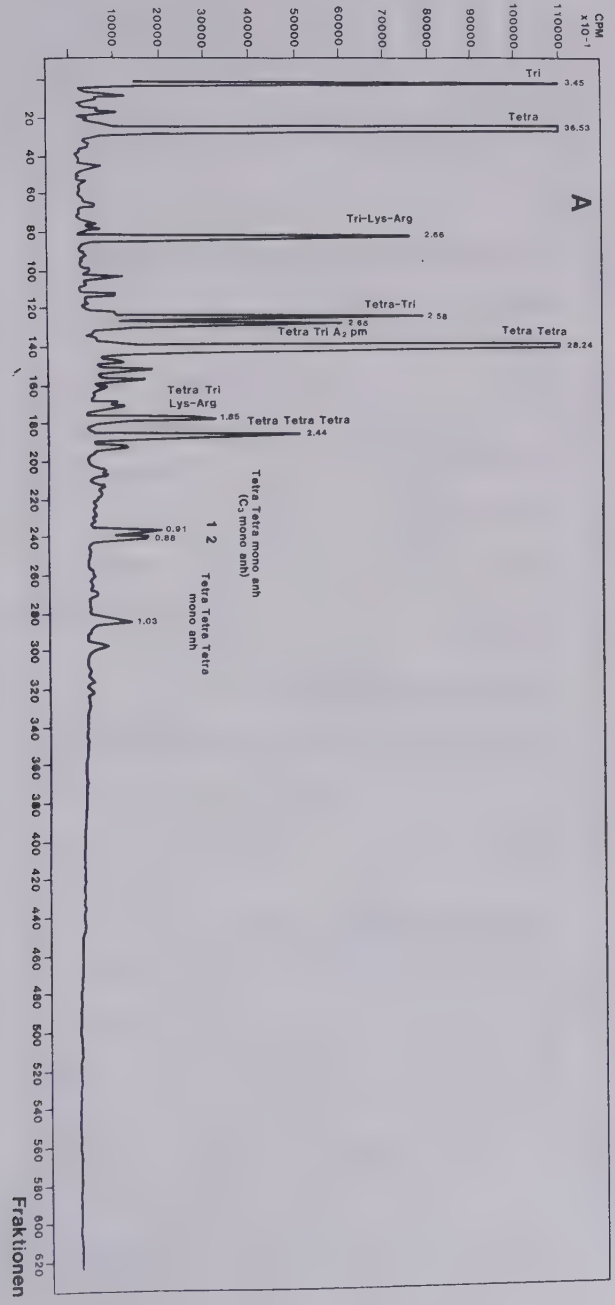
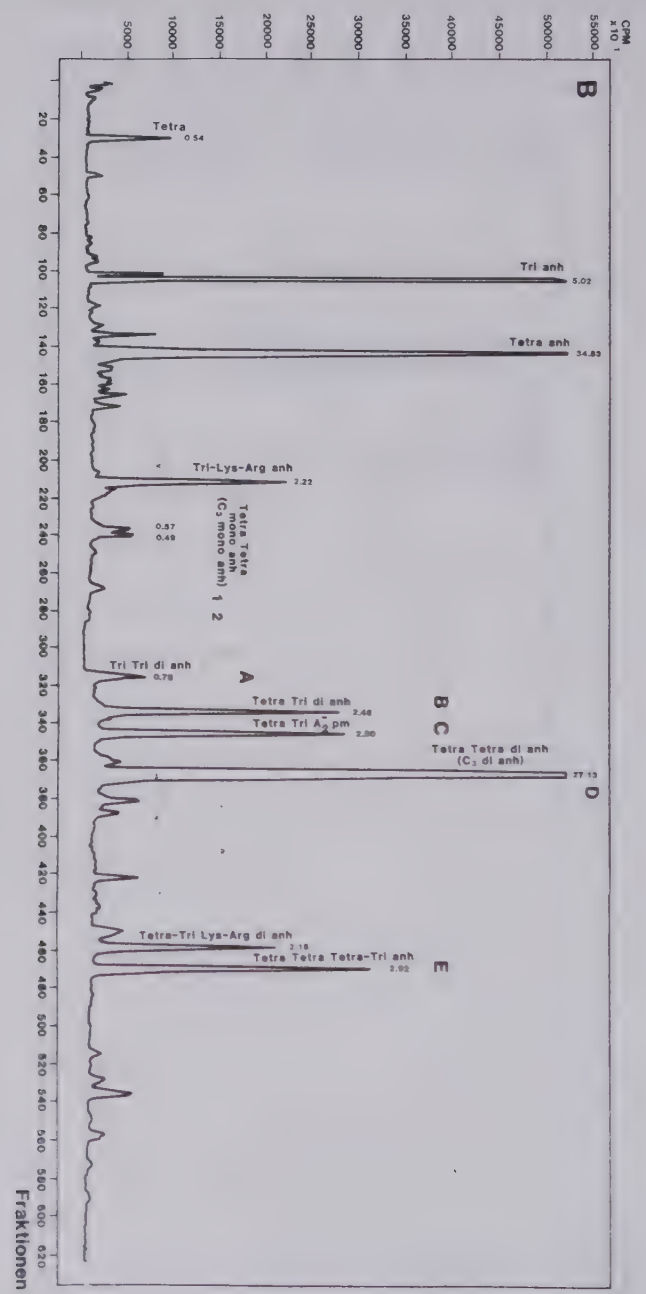


Abb. 22B: Analyse von 1,6-anhydro Muropeptiden (Transglykosylase) mit HPLC



Legende zu Abb. 22: Murein-Sacculi (750ug,0,5 mg/ml) wurden mit Transglykosylase (1 300 Einheiten) bzw. Chalaropsis-Muramidase verdaut (24h bei 37°C). Nach Kochen wurde eine jeweils 15 ug Murein entsprechende Menge über HPLC aufgetrennt und analysiert (Mat.u.Meth.).
Die wichtigsten Muropeptide sind mit Kurzbezeichnungen (Abb.19). Die mit A bis E bezeichneten Substanzen stellen quervernetzte Di- bzw. Tri-anhydro-Muropeptide dar, deren Spaltung durch Endopeptidase genauer verfolgt wurde. Substanz D ist dabei C3-dianhydro und Substanz E ein Trimeres mit mindestens 2 anhydro-Gruppen. Der Vergleich der Retentionszeiten zeigt, daß die jeweiligen anhydro-Komponenten wesentlich länger von der Säule festgehalten werden.

A. Spaltung quervernetzter Muropeptide durch Penicillin insensitive Endopeptidase (löslich)

Reduzierende und 1,6-anhydro-Muropetide (je 15ug) wurden mit Penicillin insensitiver Endopeptidase inkubiert (3,2 Einh.) und über HPLC analysiert. Da die unterschiedliche Pufferzusammensetzung bei den reduzierenden und bei den 1,6-anhydro Muropeptiden und die mögliche Existenz von hemmenden oder aktivierenden Substanzen in einem der Substrate die Endopeptidaseaktivität beeinflussen könnte, wurden die Experimente in einem Ansatz, der jeweils 15 ug reduzierende und 1,6-anhydro Muropeptide enthielt, durchgeführt. Die Experimente zeigten, daß in Proben, die sowohl anhydro als auch reduzierende Muropeptide enthalten, die anhydro-Komponenten erheblich rascher von Penicillin-insensitiver Endopeptidase gespalten werden. Dabei erfolgte der Abbau der dianhydro-Dimeren bis auf 40 bis 50 % der Ausgangsmenge linear, Trimere wurden etwas rascher, Verbindungen mit Dap/Dap-Quervernetzung etwas langsamer abgebaut (Tabelle 3 - Subst. E bzw. C). Offensichtlich werden die quervernetzten Muropeptide umso rascher gespalten, je mehr 1,6-anhydro-Muraminsäure sie haben. Wie in intakten Sacculi wird auch hier eine C3-monoanhydro-Form bevorzugt von Penicillin-insensitiver Endopeptidase

gespalten. Die Penicillin-insensitive Endopeptidase schafft offensichtlich durch spezifisches Spalten dieser C3-monoanhydro-Form im intakten Sacculus bessere Angriffspunkte für die lösliche Transglykosylase. Diese zerlegt den Sacculus in die 1,6-anhydro-Muropeptide, Penicillin-insensitive Endopeptidase überführt dann quervernetzte anhydro Komponenten in die monomeren Muropeptide

Tabelle 3 : Spaltung von quervernetzten Muropeptiden in Proben mit reduzierenden und 1,6-anhydro-Muropeptiden durch Penicillin insensitive Endopeptidase.

Substanz	Kontrolle Anteil an Gesamtmenge (%)	(%)	30 Min Anteil an Gesamtmenge (%)	(%)	Substanz	Kontrolle Anteil an Gesamtmenge (%)	(%)	30 Min Anteil an Gesamtmenge (%)	(%)
A	0,44	100	0,31	70,5	C3	21,30	100	20,25	95
B	2,01	100	1,60	79,6	C3 anh 1	1,10	100	0,89	80,9
C	1,38	100	0,76	55	C3 anh 2	0,84	100	0,82	97,6
D	16,38	100	11,75	71,6	Trim monoanh	0,77	100	0,66	85,7
E	2,01	100	1,02	50,6					

Je 15 ug reduzierende und 1,6-anhydro Muropeptide wurden mit 10 ul Endopeptidase (3 E) und dem entsprechenden Volumen 2 fach konzentriertem Endopeptidase-Testpuffer 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden in der schon beschriebenen Weise über HPLC aufgetrennt und die Menge der jeweiligen Muropeptide bestimmt (Material und Methoden).

A = bis-disaccharid-dianhydro-tri/tripeptid
B = bis-disaccharid-dianhydro-tetra/tripeptid
C = bis-disaccharid-dianhydro-tetra/tripeptid Dap/Dap
D = bis-disaccharid-dianhydro-tetrapeptid
E = Anhydro Trimeres

B) Einwirkung von membrangebundener Penicillin sensitiver Endopeptidase auf reduzierende und 1,6 anhydro Muropeptide

In E. coli ist ein zweites Enzym mit Endopeptidase-Aktivität vorhanden, nämlich PBP 4. Daher war es von Interesse, die Wirkung dieses Enzyms auf die diversen dimeren Muropeptide zu untersuchen. Reduzierende und 1,6-anhydro-Muropeptide wurden mit PBP 4 inkubiert (Abb. 23 C), die Muropeptide wurden über HPLC aufgetrennt und analysiert.Auch mit diesem Enzym wurden die Dianhydro-Muropeptide bevorzugt gespalten. Allerdings waren bei den C3 monoanhydro-Formen und bei den Substanzen A und B deutliche Unterschiede zur Penicillin-insensitiven Endopeptidase sichtbar.

Abbildung 23: Ausschnitte aus den Muropeptidmuster von reduzierenden und 1,6-anhydro-Muropeptiden.

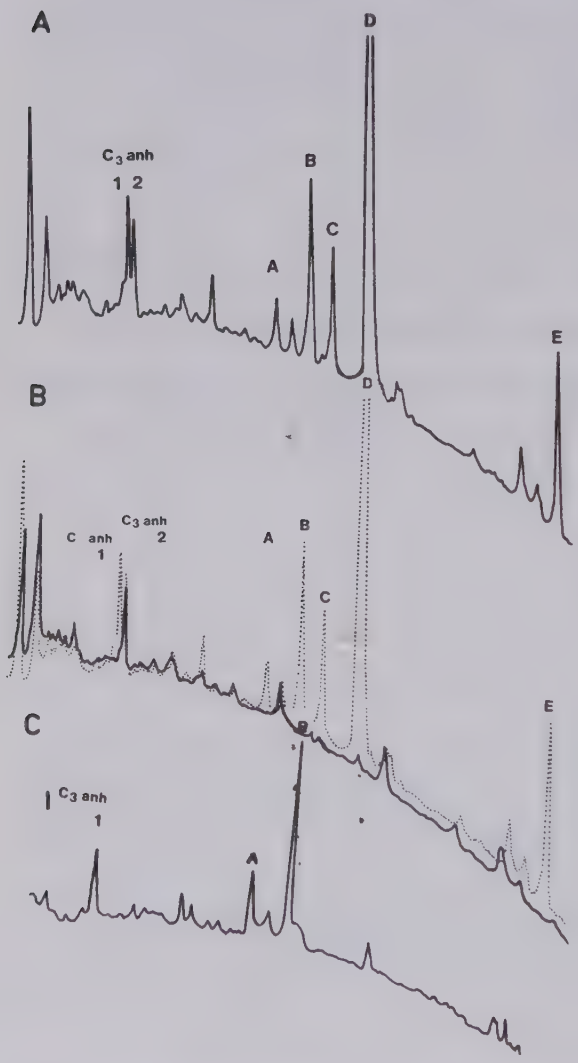


Abb. A: Kontrolle ohne Enzym

Abb. B: Mit Penicillin-insensitiver Endopeptidase inkubiert

Abb. C: Mit PBP 4 inkubiert.

Je 15ug reduzierende und 1,6-anhydro-Muropeptide wurden mit Penicillin insensitiver (15 Einh.,2h bei 37°C,siehe Abb.22 u.Tab.3) bzw. PBP 4 (8 Einh. von B.Glauner zur Verfügung gestellt, 12h bei 37°C) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über HPLC aufgetrennt und analysiert(Mat.u.Meth.). Die Muropeptide sind entweder durch Kurzbezeichnungen oder mit A-E (Abb.22) gekennzeichnet.

Die Abbildung 23 zeigt, daß die Substanzen A und B (Dimere Muropeptide mit Tripeptid-Seitenketten) von PBP 4 nicht oder nur sehr schlecht abgebaut werden, während C-E total verdaut sind. Von den beiden C3 anhdro-Formen (siehe Abb.20) wird im intakten Sacculus und auch im Muropeptidgemisch spezifisch C3 anhydro-1 von Penicillin insensitiver Endopeptidase angegriffen. Penicillin sensitive Endopeptidase (PBP 4) dagegen spaltet C3 anhydro-2 während C3 anhydro-1 nicht angegriffen wird(Abb.23 B,C). Sehr interessant ist ,daß im Murein, das von PBP 4 Mutanten synthetisiert wurde, die C3 anhydro-2-Form gegenüber Wildtypmurein erhöht ist(W. Kraus pers. Mitteilung).

DISKUSSION

A. Zusammenspiel von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopeptidase.

Die Experimente mit Sucrose-Gradienten-Zentrifugation und Gel-Filtration von löslicher Transglykosylase in Gegenwart von Penicillin-insensitiver Endopeptidase haben gezeigt, daß unter Reagenzglasbedingungen kein Komplex zwischen diesen beiden Enzymen vorliegt. Jedoch kann unter Beteiligung zusätzlicher Strukturen und Faktoren kann in der lebenden Zelle durchaus ein Komplex zwischen diesen Enzymen existieren. So findet man bei der Reinigung membrangebundener Enzyme einen nicht unerheblichen Anteil von löslicher Transglykosylase und Endopeptidase. Beide Enzyme zeigen also eine gewisse Assoziation mit der Membran/Murein-Fraktion. Schon vor dem ersten Reinigungsschritt der löslichen Enzyme wird dieses Material durch Zentrifugation abgetrennt. Eine Komplexbildung der beiden Enzyme zusammen mit anderen Membranbestandteilen, wie etwa Penicillin-Bindeproteinen, kann durch die Experimente nicht ausgeschlossen werden. Auch DNA oder Murein könnten an der Ausbildung eines Komplexes beteiligt sein da Wechselwirkungen zwischen den beiden Enzymen und diesen Polymeren nachgewiesen werden konnten (W. Kusser, Keck, diese Arbeit). Es ist auch gut möglich, daß die Penicillin insensitive Endopeptidase nur in ganz bestimmten Zeitintervallen im Zellzyklus mit der löslichen Transglykosylase einen Komplex bildet und so die Aktivität dieses Enzyms reguliert. Zur Klärung solcher Fragen müßten neue Testsysteme ausgearbeitet

werden, in denen die Murein-biosynthetischen und hydrolytischen Enzymaktivitäten unter möglichst ungestörten in vivo Bedingungen gemessen werden können; gleichzeitig sollte aber die Möglickeit bestehen, die Enzyme durch Antibiotika, Inhibitoren, Antikörper und dergleichen zu beeinflussen.

Obwohl eine Komplexbildung nicht nachgewiesen werden konnte, zeigen die hier beschriebenen Experimente jedoch, daß sich Penicillin-insensitive Endopeptidase und lösliche Transglykosylase gegenseitig in ihrer enzymatischen Aktivität stimulieren. Bei der Reaktion beider Enzyme mit Mureinsacculi werden jeweils bessere Angriffspunkte für das andere Enzym geschaffen. Dies deutet auf eine mögliche Zusammenarbeit von löslicher Transglykosylase und Penicillin-insensitiver Endopeptidase beim Mureinmetabolismus hin.
Ein enges Zusammenwirken von enzymatischen Aktivitäten, die in der Zuckerkette und solchen, die in der Peptidseitenkette angreifen, findet man in E. coli mehrfach. In den Penicillin-Bindeproteinen 1A und 1B´s sind beide Enzymaktivitäten (Transpeptidase und Transglykosylase) in einem einzigen Protein vereinigt. Bei der Kondensation von Mureinuntereinheiten zu Zuckerketten und der Knüpfung der Peptidbrücken werden von diesen bifunktionellen Proteinen genau die der LT und Epase-Aktivität entgegengesetzten Schritte katalysiert. Der Lambda -Phage kann durch effektive Zusammenarbeit von Phagen-eigener Transglykosylase und Endopeptidase das Murein in E.coli sehr rasch zerstören(84). Bei E. coli scheint also das Zusammenwirken dieser enzymatischen Aktivitäten ein wichtiges Prinzip zu sein. Daher ist es gut denkbar, daß sowohl membrangebundene Transglykosylase zusammen mit membrangebundener Endopep-

tidase als auch lösliche Transglykosylase zusammen mit Penicillin-insensitiver Endopeptidase jeweils solche Enzymsysteme darstellen.

B. Vergleich von Penicillin-insensitiver Endopeptidase und membrangebundener Endopeptidase

Die Untersuchung der Substratspezifität von membrangebundener Endopeptidase (PBP 4) ergab erste vage Hinweise auf eine Zusammenarbeit dieses Enzyms mit einer Transglykosylase. PBP 4 greift wie die lösliche Endopeptidase 1,6-anhydro-Muropeptide, die durch Transglykosylasewirkung entstehen, bevorzugt an. Jedoch unterscheiden sich die beiden Endopeptidasen in ihrem Verhalten gegenüber quervernetzten Muropeptiden mit unterschiedlicher Seitenkette erheblich. Membranenzyme und lösliche Enzyme haben offensichtlich unterschiedliche Aufgaben.
Dimere anhydro-Muropeptide mit Tripeptid-Seitenkette und die C3-Monoanhydro-Form mit der anhydro-Gruppe auf der Akzeptorseite (Abb.20) werden von PBP 4 nicht oder nur sehr schlecht angegriffen. Solche Muropeptide findet man nicht in neu synthetisiertem Murein (B.Glauner, persönl.Mitteilung), sondern in Murein, das durch Einwirkung von Carboxypeptidasen und Transpeptidasen verändert wurde. Dieses "gereifte Murein" wird von PBP 4, im Gegensatz zur Penicillin insensitiven Endopeptidase, nicht angegriffen. Das membrangebundene Enzym scheint offensichtlich in erster Linie für die Umwandlung neuen Mureins zuständig zu sein. Ob dabei die Aktivität von membrangebundener Transglykosylase durch PBP 4 stimuliert wird ist noch nicht untersucht worden. Im Gegensatz zum PBP 4

könnte die lösliche Endopeptidase zusammen mit der löslichen Transglykosylase ein Reparatursystem bilden, das bevorzugt im "alten Murein" angreift.

Die bisher in vitro durchgeführten Experimente konnten weder Beweise für ein tatsächliches Zusammenwirken von Transglykosylasen und Endopeptidase in der Bakterienzelle liefern noch erlauben sie Schlüsse über die Funktion solcher Endopeptidase/Transglykosylase-Systeme. Unter anderem wird die native Struktur des Mureins, die Zugänglichkeit potentieller Angriffspunkte von Enzymen, die natürliche Umgebung der Enzyme,in diesen reinen in vitro Experimenten jedoch nicht berücksichtigt. So ist es gut möglich, daß in vitro die enzymatischen Aktivitäten unter Bedingungen gemessen werden, die nicht mit den in den intakten Zellen vergleichbar sind. Deshalb müssen neue Testsysteme, in denen die Enzymaktivitäten direkt in der Zelle gemessen werden können, ausgearbeitet werden. Außerdem müssen Mutanten isoliert werden, bei denen die Aktivität des jeweiligen Enzyms durch Deletion vollständig fehlt und bei denen die Aufgabe des fehlenden Enzyms nicht durch andere Enzyme übernommen werden kann.

C. Mögliche Funktionen eines kooperativen Transglykosylase/Endoeptidase-Systems.

Mag ein Enzymsystem, das E. coli Murein möglichst effektiv in seine Grundbausteine zerlegen kann, für den Lambda -Phagen sinnvoll sein, so ist die Bedeutung eines derartigen eigenen Enzymsystems für E. coli zunächst unklar. Wofür könnte eine

Kooperation von Transglykosylase und Endopeptidase für die Bakterienzelle wichtig sein?

1. In Notsituationen, wie bei Nährstoffmangel, könnte das Murein bei einem Großteil der Bakterienpopulation durch Lyse in seine Grundbausteine zerlegt werden. Nicht nur die so freiwerdenden Nährstoffe, auch die Muropeptide, die eine energiereiche 1,6-anhydro Bindung an der Muraminsäure tragen, könnten dem Rest der Population das Überleben ermöglichen.

2. Ein koordiniertes Transglykosylase/Endopeptidase-System könnte auch bei einem internen Umbau des eigenen Mureins von Bedeutung sein. So könnte z.B. die von Schwarz et al. beobachtete Umverteilung (17) von neu eingebautem Murein durch eine Zusammenarbeit beider Enzyme bewirkt werden. Damit wäre dieses Enzymsystem neben anderen wesentlich mit an der Reifung des Mureins beteiligt.

3. Möglicherweise könnte der Transglykosylase und der Endopeptidase eine wichtige Funktion bei der Mureinbiosynthese zukommen. Durch begrenzte Aktion dieser Enzyme könnte die Beweglichkeit von Zuckerketten in bereits vorhandenem Murein erhöht werden. Diese könnten dadurch wieder für die membrangebundenen biosynthetischen Enzyme zugänglich werden. Unter Ausnutzung der Bindungsenergie der 1,6-anhydro Muraminsäure könnten die Mureinsynthetasen dann neue Bausteine in die bereits vorhandene Zuckerkette einfügen. So würden neue Wachstumsstellen in einem Bereich des Mureinsacculus geschaffen, der sich nicht mehr in der Wachstumszone befindet.

4. Das Transglykosylase/Endopeptidasesystem könnte zur Zelltrennung wichtig sein. Durch räumlich und zeitlich eng

begrenztes Wirken dieser Enzyme wird ein Teil des in der Zellmitte wahrscheinlich mehrschichtigen Mureins abgebaut (Abb.24), sodaß sich die Zellen trennen können. Die dabei freigesetzten Muropeptide tragen eine energiereiche 1,6-anhydro-Muraminsäure und könnten somit wiederverwendet werden. Eine auf die Zellmitte beschränkte Murein-hydrolysierende Aktivität nachgewiesen werden (22). Außerdem wurde gezeigt, daß es in der Zelle in Abhängigkeit von der DNS-Replikation zu einer Steigerung der Mureinhydrolasenaktivität unmittelbar vor der Zellteilung kommt (57,58). Interessanterweise hat die Zelle in der Zellmitte ein vom Zytoplasma und Periplasma abgetrenntes Kompartiment (periseptales Kompartiment,128, Abb.24), das für die notwendige räumliche Kontrolle der Zellteilung von Bedeutung sein könnte.

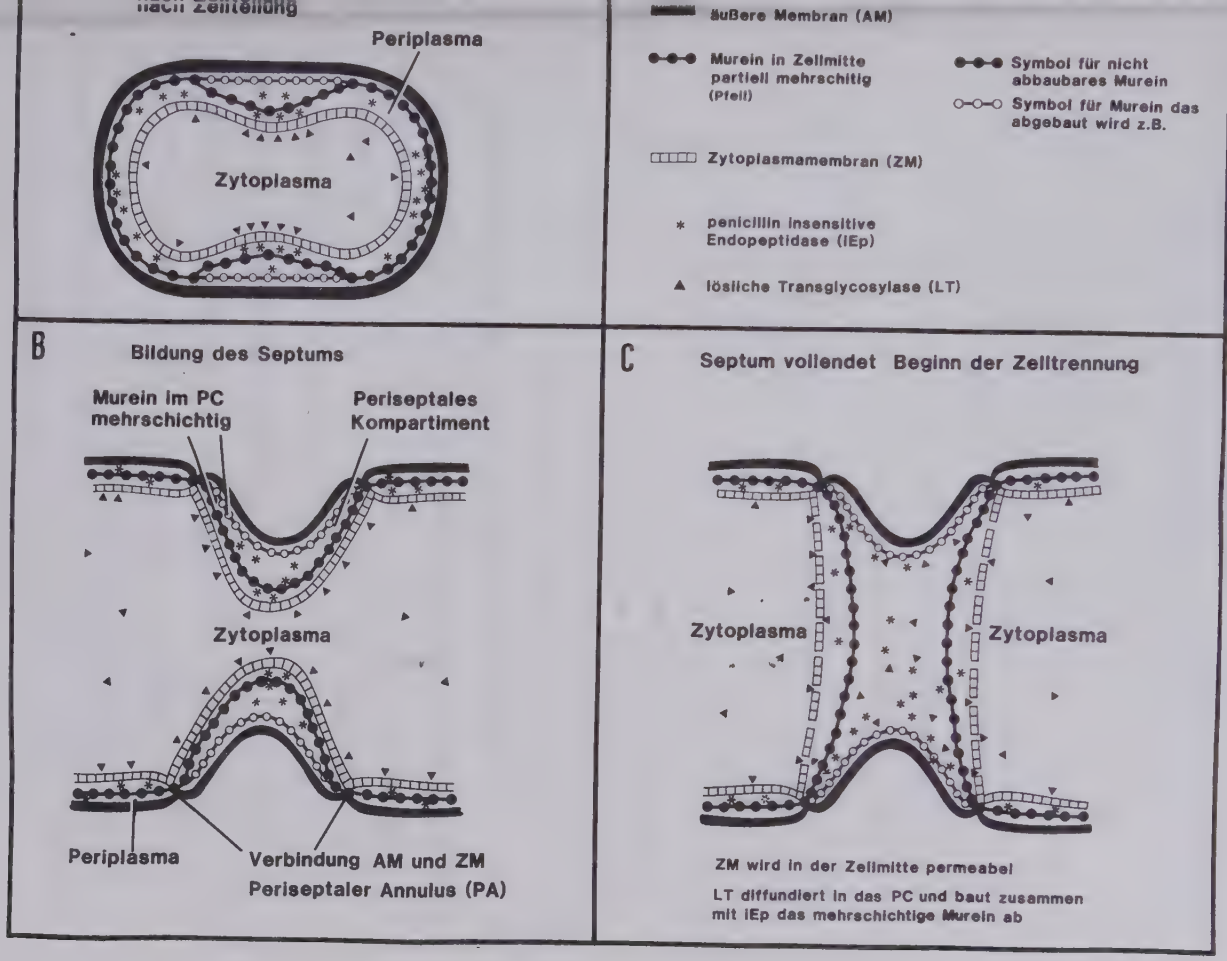


Abb.24: Modell zur Wirkungsweise des Transglykosylase/Endopeptidase-Systems.

Abb. 24 A:

In der Zellmitte ist das Murein mehrschichtig. Dadurch kann der Einbau von Mureinvorstufendes in das zunächst wenig quervernetzte Septum-Murein, trotz des in der Zelle herrschenden hohen osmotischen Druckes (129), ohne mechanische Beanspruchung erfolgen. Die Penicillin insensitive Endopeptidase befindet sich im Periplasma. Da dieses Enzym im intakten Murrein nur ca. 2% der Peptidbrücken spalten kann, wird das Murein mechanisch nicht destabilisiert. Lösliche Transglykosylase befindet sich im Zytoplasma und kann das Murein nicht angreifen.

Abb. 24 B:

Bildung des Septums; in der Zellmitte entsteht durch Fusion von Äußerer-und Zytoplasmamembran (periseptaler Annulus) das periseptale Kompartiment; Endopeptidase ist im Periplasma und im periseptalen Kompartiment; Transglykosylase im Zytoplasma

Abb. 24 C:

Das Septum ist gebildet; Beginn der Zelltrennung; Ein durch die DNA-Replikation ausgelöstes Signal (zeitliche Kontrolle) bewirkt kurz vor der Zelltrennung eine lokale Permeabilisierung der Zytoplasmamembran (räumliche Kontrolle); die Transglykosylase kann ins periseptale Kompartiment eindringen und zusammen mit Endopeptidase das Murein abbauen und die Zelltrennung ermöglichen. Die entstehenden energiereichen 1,6-anhydro-Muropeptide können unter Ausnutzung der Bindungsenergie der 1,6-anhydro-Bindung wieder zur Mureinbiosynthese verwendet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Weidel, W. and Pelzer, H. (1964). Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls. Adv.Enzymol. 26, 193-232.

2. Schwarz, U. and Leutgeb, W. (1971). Morphogenetic aspects of murein structure and biosynthesis. J.Bact. 106, 588-595.

3. Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli. BBA 415, 335-377.

4 Yamada, H. and Mizushima, S. (1977). Lipoprotein-bearing sacculus as a prefered site for in vitro assembly of form dissociated components of outer membrane of Escherichia coli K12. J.Biochem. 81, 1889-1899.

5 Yamada, H. and Mizushima, S. (1978). Reconstitution of an ordered structure from major outer membrane constituents and the lipoprotein-bearing peptidoglycan sacculus of Escherichia coli. J.Bact. 135, 1024-1031.

6. Glauner, B. (1982). Analyse des Mureins von E. coli mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Erste Charakterisierung neuartiger Mureinkomponenten. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

7. Schindler, M., Mirelman, D., and Schwarz, U. (1976). Quantitative determination of N-acetylglucosamine residues at the non-reducing ends of peptidoglycan chains by enzymic attachment of ^{14}C-D-galactose. Eur.J.Biochem. 71, 131-134.

8. Verwer, R.W.H., Nanninga, N., Keck, W., and Schwarz, U. (1978). Arrangement of glycan chains in the sacculus of Escherichia coli. J.Bact. 136, 723-729.

9. Braun, V. and Rehn, K. (1969). Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E. coli cell walls. Eur.J.Biochem. 10, 426-438.

10. Höltje, J.-V., Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in Escherichia coli. J.Bact. 124, 1067-1076.

11. Taylor, A., Das, B.C., and van Heijenoort, J. (1975). Bacterial cell wall peptidoglycan fragments produced by phage-lambda or ViII endolysine and containing 1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid. Eur.J.Biochem. 53, 47-54.

12. Keck, W. (1980). Zur Komplexität des Mureinhydrolasen systems in E. coli.
Dissertation, Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

13. Koch, A.L., Higgins, M.L., and Doyle, R.J. (1982). The role of surface stress in the morphology of microbes.
J.Gen.Microbiol. 128, 927-945.

14. Mett, H., Bracha, R., and Mirelman, D. (1980). Soluble nascent peptidoglycan in growing E. coli cells.
J.Biol.Chem. 255, 9884-9890.

15. Goodell, E.W., Markiewicz, Z., and Schwarz, U. (1983). Absence of oligomeric murein intermediates in E. coli.
J.Bact. 156, 130-135.

16. Ryter, A., Hirota, Y., and Schwarz, U. (1973). Process of cellular division in Escherichia coli - Growth pattern of E. coli.
J.Mol.Biol. 78, 185-195.

17. Schwarz, U., Ryter, A., Hellio, R., and Hirota, Y. (1975). Process of cellular division in E. coli: Differentiation of growth zones in the sacculus.
J. Mol Biol. 98, 749-759.

18. Satta, G., Canepari, P., and Fontana, R. (1983). A novel hypothesis to explain regulation of the murein sacculus shape.
In The Target of Penicillin, Hakenbeck, Höltje, Labischinski (eds), Walter de Gruyter Verlag, Berlin.

19. Spratt, B.G. (1975). Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of Escherichia coli K12.
PNAS U.S.A. 72, 2999-3003.

20. Spratt, B.G. (1977). Temperature-sensitive cell division mutants of Escherichia coli with thermolable penicillin-binding protein.
J.Bact. 131, 293-305.

21. Cooper, P.D. (1956). Site of action of radiopenicillin.
Bacteriol.Rev. 20, 28-48.

22. Schwarz, U., Asmus, A., and Frank, H. (1969). Autolytic enzymes and cell division of Escherichia coli.
J.Mol.Biol. 41, 419-429

23. Park, J.T. (1952). Uridine-5´-pyrophosphate derivatives.
J.Biol.Chem. 194, 877-884.

24. Blumberg, P.M., Strominger, J.L. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes.
Bacteriol.Rev. 38, 291-335.

25. Izaki, K., Matsuhashi, M., and Strominger, J.L. (1968).

Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. J.Biol.Chem. 243, 3180-3192.

26. Izaki, K. and Strominger J.L. (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. J.Biol.Chem. 243, 3193-3201.

27. Suginaka, H., Blumberg, P.M., and Strominger,J.L. (1972). Multiple penicillin-binding components in Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. J.Biol.Chem. 247, 5279-5288.

28. Blumberg, P.M. and Strominger, J.L. (1972). Five penicillin-binding components occur in Bacillus subtilis membranes. J.Biol.Chem. 247, 8107-8113.

29. Spratt, B.G. and Pardee, A.B. (1975). Penicillin-binding proteins and cell shape in E. coli. Nature 254, 516-517.

30. Spratt, B.G., Jobanputra, V., and Schwarz, U. (1977). Mutants of Escherichia coli which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. FEBS Lett. 79, 374-378.

31. Schwarz, U., Seeger, K., Wengenmayer, F., and Strecker, H. (1981). Penicillin-binding proteins of Escherichia coli identified with ^{125}I-derivative of ampicillin. FEMS Lett. 10, 107-109.

32. Waxman, D.J. and Strominger, J.L. (1980). Sequence of active site peptides from the penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase of Bacillus subtilis. J.Biol.Chem. 255, 3964-3976.

33. Yocum, R.R., Rasmussen, J.R., and Strominger, J.L. (1980). The mechanism of action of penicillin. J.Biol.Chem. 255, 3977-3986.

34. Glauner, B., Keck, W. and Schwarz. U. (1984). Manuskript in Vorbereitung.

35. Keck, W., Kraut, H., and Kraus, W., Manuskript in Vorbereitung.

36. Tamaki, S., Nakajima, S., and Matsuhashi, M. (1977). Thermosensitive mutation in E. coli simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1b's and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in vitro. PNAS U.S.A. 74, 5472-5476.

37. Spratt, B.G. (1980). Deletion of the penicillin-binding protein 5 gene of E. coli. J.Bact. 144, 1190-1192.

38. Broome-Smith, J.K. and Spratt, B.G. (1982). Deletion of the penicillin-binding protein 6 gene of E. coli.

J.Bact. 152, 904-906.

39. Iida, K., Hirota, Y., and Schwarz, U. (1983). Mutants of E. coli defective in penicillin-insensitive murein DD-endopeptidase.
Mol.Gen.Genet. 189, 215-221.

40. Markiewicz, Z., Broome-Smith, J.V., Schwarz, U., and Spratt, B.G. (1982). Spherical E. coli due to elevated levels of D-alanine carboxypeptidase.
Nature 297, 702-704.

41. Matsuhashi, M., Nakagawa, I., Ishino, F., Nakajima-Jijima, S., Tomioka, S., Doi, M., and Tamaki, S. (1981). Penicillin-binding proteins: Their nature and functions in the cellular duplication and mechanism of action of ß-lactam antibiotics in E. coli. In ß-Lactam Antibiotics, Mitsuhashi, S. (ed.), pp. 203-223.

42. Nakagawa, J., Tamaki, S., Matshashi, M. (1979).
Agric.Biol.Chem. 43, 1379-1380.

43. Tomioka, S., Ishino, F., Tamaki, S., Matsuhashi, M. (1982). Formation of hyper-crosslinked peptidoglycan with multiple crosslinkage by a penicillin-binding protein 1A of E. coli.
Biochem.Biophys.Res.Comm.106, 1175-1182.

44. Ishino, F., Mitsui, D., Tamaki, S., and Matsuhashi, M. (1980). Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparation of E. coli penicillin-binding protein 1A.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 97, 287-293.

45. Ishino, F., Tamaki, S., Spratt, B.G., and Matsuhashi, M. (1982). A mecillinam-sensitive peptidoglycan crosslinking reaction in E. coli.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 109, 689-696.

46. Ishino, F. and Matsuhashi, M. (1981). Peptidoglycan synthetic activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in E. coli: A septum forming reaction sequence.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 101, 905-911.

47. Suzuki, H., Van Heijenoort, Y., Tamura, T., Mitsogushi, I., Hirota, Y., and Van Heijenoort, J. (1980). In vitro peptidoglycan polymerization catalyzed by penicillin-binding protein 1B of E. coli K-12.
FEBS Lett. 110, 245-249.

48. Iwaya, M. and Strominger, J.L. (1977). Simultaneous deletion of D-alanine carboxypeptidase IB-C and penicillin-binding component IV in a mutant of E. coli K-12.
PNAS USA 74, 2980-2984.

49. Goodell, E.W. and Schwarz, U. (1983). Cleavage and resynthesis of peptide crossbridges in E. coli murein.
J.Bact. 156, 136-140.

50. De Pedro, M.A., Schwarz, U., Nishimura, Y., and Hirota, Y.

(1980). On the biological role of penicillin-binding proteins 4 and 5.
FEMS Microbiol.Lett.9, 219-221.

51. Tamura, T., Imae, Y., and Strominger, J.L. (1976). Purification to homogeneity and properties of two D-alanine-carboxypeptidases I from E. coli.
J.Biol.Chem. 251, 414-423.

52. Spratt, B.G. and Strominger, J.L. (1976). Identification of the major penicillin-binding proteins of E. coli as D-alanine carboxypeptidase IA.
J.Bact. 127, 660-663.

53. Matsuhashi, M., Maruyama, J.N., Tagaki, Y., Tamaki, S., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978). Isolation of a mutant of E. coli lacking penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase IA.
PNAS USA 75, 2631-2635.

54. Matsuhashi, M., Tamaki, S., Curtis, S.J., and Strominger, J.L. (1979). Mutational evidence for identity of penicillin-binding protein 5 in E. coli with the major D-alanine carboxypeptidase IA activity.
J.Bact. 137, 644-647.

55. Nishimura, Y., Suzuki, H., Hirota, Y., and Park, J.T. (1980). A mutant of E. coli defective in penicillin-binding protein 5 and lacking D-alanine carboxypeptidase IA.
J.Bact. 143, 531-534.

56. Amanuma, H. and Strominger, J.L. (1980). Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from E. coli membranes.
J.Biol.Chem. 255, 11173-11180.

57. Hoffmann, B., Messer, W., and Schwarz, U. (1972). Regulation of polar cap formation in life cycle of E. coli.
J.Supramolec.Struct. 1, 29-31.

58. Hakenbeck, R. and Messer, W. (1977). Activity of murein hydrolases in synchronized cultures of E. coli.
J.Bact. 129, 1239-1244.

59. Beck, B.D. and Park, J.T. (1976). Activity of three murein hydrolases during the cell division cycle of E. coli K-12 as measured in toluene-treated cells.
J.Bact. 126, 1250-1260.

60. Beck, B.D. and Park, J.T. (1977). Basis for the observed fluctuation of carboxypeptidase II activity during cell cycle in BUG 6, a temperature-sensitive division mutant of E. coli.
J.Bact. 130, 1292-1302.

61. Leduc, M., Kasra, R., and Van Heijenoort, J. (1982). Induction and control of the autolytic system of E. coli.
J.Bact. 152, 26-34.

62. Van Heijenoort, J., Leduc, M., Van Heijenoort, Y., and

Kasra, R. (1983). Autolysis of E. coli: Induction and control. In The Target of Penicillin (Hakenbeck, Höltje, Labischinski, eds.) de Gruyter-Verlag, Berlin.

63. Dela Rosa, E.J., de Pedro, M.A., and Vazquez, D. (1982). Modification of penicillin-binding proteins of E. coli associated with changes in the state of growth of the cells.
Fems. Microbiol. Lett. 14, 91-94

64. Wientjes, F.B., Olijhoek, T.J.M., Schwarz, U., and Nanninga, N. (1983). Labelling pattern of major penicillin-binding proteins of E. coli during the division cycle.
J.Bact. 153, 1287-1293.

65. Nakagawa, J. and Matsuhashi, M. (1982). Molecular divergence of a major peptidoglycan synthetase with transglycosylase/transpeptidase activity in E. coli - penicillin-binding proteins Ibs.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 105, 1546-1553.

66. Höltje, J.-V. and Tomasz, A. (1975). Specific regcognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of Pneumococcus.
J.Biol.Chem. 250, 6072-6076.

67. Höltje, J.-V. and Tomasz, A. (1975). Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysine activity in Pneumococcus.
PNAS USA 72, 1690-1694.

68. Höltje, J.-V. and Schwarz, Ulla (1983). Coenzyme A - Glutathione disulfide: An endogenous inhibitor of the lytic enzymes in E. coli. In The Target of Penicillin (Hakenbeck, Höltje, Labischinski, eds.) de Gruyter-Verlag, Berlin.

69. Goodell, E.W. and Schwarz, U. (1977). Enzymes synthetizing and hydrolyzing murein in E. coli. Topographical distribution over the cell envelope.
Eur.J.Biochem. 81, 205-210.

70. Buchanan, C.E. (1981). Topographical distribution of penicillin-binding proteins in the E. coli membrane.
J.Bact. 145, 1293-1298.

71. Ishiguro, E.E. and Ramey, W.D. (1976). Stringent control of peptidoglycan biosynthesis in E. coli K-12.
J.Bact. 127, 1119-1126.

72. Ishiguro, E.E. and Ramey, W.D. (1978). Involvement of the rel A gene product and feedback inhibition in the regulation of UDP-N-acetylmuramyl-peptide synthesis in E. coli.
J.Bact. 135, 766-774.

73. Harkness, R.E., Mirelman, D., and Ishiguro, E.E. (1981). Regulation of D-alanine carboxypeptidase and peptidoglycan crosslinkage in amino acid-deprived E. coli. J.Bact. 145, 845-849.

74. Ramey, W.D. and Ishiguro, E.E. (1978). Site of inhibition of peptidoglycan biosynthesis during the stringent response in E. coli. J.Bact. 135, 71-77.

75. Hartmann, R., Bock-Henning, S.B., and Schwarz, U. (1974). Murein hydrolases in the envelope of E. coli., Eur.J.Biochem. 41, 203-208.

76. Perkins, H.P., Chapman, S.J., and Blundell, K.J. (1983). O-acetylation and hydrolases of gonococcal peptidoglycan. In The Target of Penicillin. (Hakenbeck, Höltje, Labischinski, eds.) De Gruyter-Verlag, Berlin.

77. Goodell, E.W. and Tomasz, A. (1980). Alteration of E. coli murein during amino acid starvation. J.Bact. 144, 1009-1016.

78. Keck, W. and Schwarz, U. (1979). Escherichia coli murein-DD-endopeptidase insensitive to ß-lactam antibiotics. J.Bact. 193, 770-774.

79. Tomioka, S. and Matsuhashi, M. (1978). Purification of penicillin-insensitive DD-endopeptidase, a new cell wall peptidoglycan hydrolyzing enzyme in E. coli, and its inhibition by deoxyribonucleic acids. Biochem.Biophys.Res.Comm. 84, 978-984.

80. Kusser, W. and Schwarz, U. (1980). E. coli murein transglycosylase, purification by affinity chromatography and interaction with polynucleotides. Eur.J.Biochem. 103, 277-281.

81. Keck, W. Persönliche Mitteilung.

82. Said, I.M. (1983). Nachbarschaftsbeziehungen der Penicillin-Bindeproteine in E. coli. Dissertation, Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

83. Kitano, K., Williamson, R., and Tomasz, A. (1980). Murein hydrolase defect in the ß-lactam tolerant mutants of E. coli. FEMS Microbiol.Lett. 7, 133-136.

84. Bienkowska-Szewczyk, K., and Taylor, A. (1980). Murein-transglycosylase from phage lambda-lysate, purification and properties. BBA 615, 489-496.

85. Bienkowska-Szewczyk, K., Lipinska, B., and Taylor, A. (1981). The R gene product of bacteriophage lambda is the murein transglycosylase. Mol.Gen.Genet. 184, 111-114.

86. Mardarowicz, C. (1966). Isolierung und Charakterisierung des Mureinsacculus von Brucella.
Z.Naturforsch. 21b, 1006-1007.

87. Leutgeb, W. and Weidel, W. (1963). Über ein in Coli-Zellwand-Präparaten zurückgehaltenes Glykogen.
Z.Naturforsch. 18b, 1060-1062.

88. Pelzer, H. (1965). Ein einfaches Verfahren zur Gewinnung beliebig großer Mengen bakterieller Zellwände und Stützmembranen.
Archiv.Microbiol. 50, 334.342,

89. Höltje, J.-V. (1973). Reinigung und Charakterisierung einer Murein-Transglykosaminidase aus E. coli.
Dissertation, Fachbereich Biochemie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

90. Mett, H., Keck, W., Funk, A., and Schwarz, U. (1980). Two different species of murein transglycosylase in E. coli.
J.Bact. 144, 45-52.

91. Pelzer, H. (1963). Mucopeptidhydrolasen in E. coli B.
Z.Naturforsch. 18b, 950-964.

92. Eshdat, Y. and Mirelman, D. (1972). An improved method for the recovery of compounds from paper chromatograms.
J.Chromatogr. 65, 458-459.

93. Martin, R.G. and Ames, E.N. (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: Application to protein mixtures.
J.Biol.Chem. 236, 1372-1379.

94. Schaman, H.K. (1959). Ultracentrifugation in Biochemistry.
Academic Press, Vol. 12, New York.

95. Lugtenberg, B., Meijers, J., Van der Hoek, P., and Van Alphen, L. (1975). A electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of E. coli K-12 into four bands.
FEBS Lett. 58, 254-258.

96. Weber, K. and Osborn, N. (1969). The reliability of molecular weight determinations by doceylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J.Biol.Chem. 244, 4406-4412.

97. Goding, J.W. (1976). Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods.
J.Immun.Meth. 13, 215-220.

98. Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R. (1978). Isolation of pure IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunglobulins from mouse serum using protein A-sepharose.
Immunochemistry 15, 429-436.

99. Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, Ch.F. (1980).

Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitro cellulose sheets.
Anal.Biochem. 102, 459-471.

100. Bullok, Y.R. and Petrasz, P. (1982). Techniques in Immunochemistry, Vol. 1, pp.91-105, Academic Press.

101. Sternberger, L.A., Hardy, P.H.Jr., Caculi, J.J., and Meyer, H.G. (1970). The unlabelled antibody enzyme method of immunochemistry.
J.Histochem.Cytochem. 18, 315-333.

102. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275.

103. Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding.
Anal.Biochem. 72, 248-254.

104. Morissey, J. (1981). Silverstain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity.
Anal.Biochem. 117, 307-310.

105. Hayashi, K. (1975). A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue.
Anal.Biochem. 67, 503-506.

106. Hash, J.H. and Rothlauf, M.V. (1967). The N,O-diacetylmuramidase of Chalaropsis species. I. Purification and Crystallization.
J.Biol.Chem. 242, 5586-5590.

107. Livingston, D. Immunoaffinity Chromatography of Proteins. In Methods in Enzymology, Vol. XXXIV, pp. 723-731.

108. Woliky, N. and Weetall, H.H. (1972). Studies of antigen-antibody interaction on some specific solid adsorbents derived from cellulose.
Immunochemistry 9, 967-978-

109. Yoshimoto, T. and Tsuru, D. (1974). Affinity chromatography of lysozyme on a sepharose derivative coupled with lysozyme lysate of bacterial cell wall.
J.Biochem. 76, 887-889.

110. Yoshimoto, T., Hayashida, S., Tobiishi, M., Kado, K., and Tsuru, D. (1975). Purification of several bacteriolytic enzymes by affinity chromatography on lysozyme lysate of Micrococcus lysodeikticus cell wall coupled with sepharose.
J.Biochem. 78, 253-259.

111. Schwarz, U. Persönliche Mitteilung.

112. Chromatofocusing with Polybuffer™ and PBE™.

Pharmacia-Broschüre.

113. Wientjes, F.B. Persönliche Mitteilung.

114. Wientjes, F.B. Persönliche Mitteilung.

115. Wientjes, F.B. Unveröffentlichte Ergebnisse.

116. Powell, J.T. and Morrison, J.F. (1979). Enzyme-enzyme interaction and biosynthesis of aromatic amino acids in E. coli.
BBA 568, 467-474.

117. Kalman, M., and Boross, L. (1982). Characterization of enzyme-enzyme interaction using an affinity batch system.
BBA 704, 272-277.

118. Fahien, L.A. and Van Engelen, D.L. (1976). A study of the aminotransferase-glutamate dehydrogenase complex with anilinønaphthalene sulfonate.
Arch.Biochem.Biophys. 176, 298-305.

119. Gavilanes, F., Salerno, C., and Fasella, P. (1981). Heterologous enzyme-enzyme complex between D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase and triosephosphate isomerase from Ceratitis capitata.
BBA 660, 154-156.

120. Ovadi, I., Salerno, C., Keleti, T., and Fasella, P. (1978). Physicochemical evidence for the interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
Eur.J.Biochem. 90, 499-503.

121. Fahien, L.A., Ruoho, A.E., and Kmiotek, E. (1978). A study of glutamate dehydrogenase - aminotransferase complexes with a bifunctional imidate.
J.Biol.Chem. 253, 5745-5751.

122. Mowbray, J. and Moses, V. (1976). The tentative identification in E. coli of a multienzyme complex with a glycolytic activity.
Eur.J.Biochem. 66, 25-36.

123. Ahmed, S.J. and Giles, N.H. (1969). Organization of enzymes in the common aromatic synthetic pathway: Evidence for aggretation in fungi.
J.Bact. 99, 231-237.

124. Mori, M. and Tatibana, M. (1978). Multi enzyme complex of glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthetase with aspartate carbamoyltransferase and dihydroorotase from rat ascites-hepatoma cells.
Eur.J.Biochem. 86, 381-388.

125. Fahien, L.A. and Smith, S.E. (1969). Studies of gluconeogenic mitochondrial enzymes.
Arch.Biochem.Biophys. 135, 136-151.

126. Smith, G.K., Müller, T., Wassermann, G.F., Taylor, W.D.,

and Benkovic, S.J. (1980). Characterization of the enzyme complex involving the folate-requiring ezymes of de novo purine biosynthesis.
Biochemistry 19, 4313-4321.

127. Halpin, R.A., Hegeman, G.D. and Kanyon, G.L. (1981). Carbon-13-nuclear magnetic resonance studies of mandelate metabolism in whole bacterial cells and in isolated, in vivo cross-linked enzyme complexes.
Biochemistry 20, 1525-1533.

128. Mac Alister, T.J., Mac Donald, B., and Rothfield, L.J. (1983). The periseptal annulus: An organelle associated with cell division in gram-negative bacteria.
PNAS USA 80, 1372-1376.

129. Koch, A.L. (1982). On the growth and form of E. coli.
J.Gen.Microbiol. 128, 2527-2539.

Lebenslauf

Am 28. 10. 1954 wurde ich, Karl-Heinz Müller, als Sohn des Mechanikermeisters Karl Müller und seiner Ehefrau Maria, geb. Aiss, in Rottenburg/Neckar geboren. Im Frühjahr 1962 wurde ich in Rottenburg eingeschult. Im Frühjahr 1966 wechselte ich an das Eugen-Bolz-Gymnasium in Rottenburg. Dort legte ich am 25. 6. 1974 die Reifeprüfung ab. An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen begann ich im Oktober 1974 das Pharmaziestudium. Am 9. 9. 1976 bestand ich dort den ersten, am 14. 3. 1978 den zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung. Vom Juni 1978 bis Mai 1979 war ich als Pharmazie-Praktikant in der Bären-Apotheke in 7778 Markdorf beschäftigt. Am 25. 6. 1979 bestand ich in Stuttgart die Pharmazeutische Prüfung. Die Approbation als Apotheker erhielt ich am 12. 7. 1979. Vom Januar 1980 bis März 1984 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen unter der Anleitung von Dr. U. Schwarz und Dr. J. V. Höltje an meiner Dissertation.

MEINE AKADEMISCHEN LEHRER WAREN:

A.W. Alfermann

H.P.T. Ammon

H. Auterhoff

R.E. Bader

W. Cyran

E. Graf

H. Hámacher

M. Hanak

J.V. Höltje

K.A. Kovar

E. Lindner

E.W. Mechler

W. Nakel

F. Oberwinkler

H. Pommer

E. Reinhard

J. Schultz

U. Schwarz

H. Seiler

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353